

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



Scuola Politecnica e delle Scienze di Base

Dottorato di ricerca in Biologia Applicata

XXVIII ciclo

Tesi di Dottorato

“Fisiologia delle piantine di orzo esposte allo stress da cadmio”

“Physiology of barley seedlings exposed to cadmium stress”

**Coordinatore
Ch. mo Prof.
Ezio Ricca**

**Candidato
Dott.
Marco Lentini**

**Tutor
Ch. mo Prof.
Sergio Esposito**

INDICE

1. INTRODUZIONE	9
1.1. I metalli pesanti	12
1.2. Il cadmio	14
1.3. L'assorbimento del cadmio nelle piante	15
1.4. Distribuzione del cadmio nei vari organi vegetali	17
1.5. Distribuzione del cadmio nei tessuti vegetali	18
1.6. Il trasporto del cadmio attraverso la pianta	20
1.7. Localizzazione intracellulare del cadmio	22
1.8. Effetti del cadmio sulle attività enzimatiche	24
1.9. Effetti del sull'assorbimento dei minerali	26
1.10. Effetti del cadmio sul regime idrico	27
1.11. Effetti del cadmio sulla respirazione cellulare	29
1.12. Effetti del cadmio sulla fotosintesi	29
1.13. Effetti del cadmio sulla crescita e sulla morfogenesi delle piante	32
1.14. Meccanismi di risposta allo stress da cadmio a livello cellulare	34
1.15. Il cadmio e la produzione delle specie reattive dell'ossigeno	37
1.16. Il cadmio e la produzione delle Heat Shock Proteins	39
1.17. Il cadmio e la sintesi di etilene	40
1.18. Il cadmio e l'omeostasi cellulare	41
1.19. <i>Hordeum vulgare</i>	43
1.20. Caratteri morfologici	44
1.21. Caratteristiche <i>Hordeum vulgare</i> varietà Nure	47
2. SCOPO DELLA TESI	49
3. MATERIALI E METODI	50

3.1. Coltivazione delle piantine d'orzo	50
3.2. Analisi fenotipiche delle piantine d'orzo	53
3.3. Determinazione della capacità fotosintetica e dello stato fisiologico	53
3.4. Estrazione delle proteine Rubisco, D1, G6PDH e HSP70	57
3.5. Saggio di Bradford	59
3.6. Elettroforesi in condizioni denaturanti	59
3.7. Western Blotting	63
3.8. Percentuale d'inibizione di crescita	66
3.9. Water Content	66
3.10. Determinazione del contenuto di pigmenti fogliari	67
3.11. Analisi del contenuto di amido	68
3.12. Microscopia elettronica a scansione (SEM)	70
3.13. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	70
3.14. Saggio enzimatico G6PDH	71
3.15. Estrazione e misura dell'attività della nitrato reductasi	71
3.16. Estrazione amminoacidi	73
3.17. Analisi degli amminoacidi	74
4. RISULTATI	76
4.1. Analisi statistica	76
4.2. Analisi fenotipiche	76
4.3. Determinazione della percentuale d'inibizione di crescita e del contenuto d'acqua	80
4.4. Analisi ultrastrutturali (SEM)	81
4.5. Analisi ultrastrutturali (TEM)	83
4.6. Determinazione del contenuto di pigmenti fogliari	86

4.7. Determinazione dei principali indici fotochimici	89
4.8. Determinazione del contenuto di amido	89
4.9. Analisi dei livelli delle HSP70	90
4.10. Analisi dei livelli della Rubisco e della proteina D1	92
4.11. Determinazione dei livelli e dell'attività della G6PDH	93
4.12. Determinazione dell'attività della nitrato reductasi	96
4.13. Contenuto di amminoacidi liberi	98
5. DISCUSSIONE	100
6. CONCLUSIONI	113
7. BIBLIOGRAFIA	115

ABSTRACT

I metalli pesanti sono importanti inquinanti ambientali e la loro tossicità è un problema di crescente importanza per motivi ecologici, evolutivi, nutrizionali e ambientali. Il cadmio (Cd) è, tra i metalli pesanti non essenziali, quello che ha attirato maggiormente l'attenzione nel campo della nutrizione delle piante, a causa della sua potenziale tossicità per l'uomo, e anche la sua relativa mobilità nel sistema suolo-pianta.

Il progetto di dottorato si è proposto lo studio dei meccanismi di risposta - su base micro e macroscopica, fisiologica, ecologica e biochimica - allo stress da cadmio, su una pianta di elevato interesse agricolo ed economico: l'orzo (*Hordeum vulgare*). In particolare, sono stati osservati gli effetti causati dal cadmio su piantine d'orzo esposte alle concentrazioni di 10^{-6} M, 10^{-5} M e 10^{-4} M. Sono stati determinati la presenza di danni ultrastrutturali indotti dalla presenza del cadmio mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM), e relazionati alla presenza e alle variazioni delle varie isoforme (citosolica, cloroplastica e mitocondriale) di Heat Shock Protein 70 (HSP70), nelle radici e nelle foglie, dei campioni stressati. Inoltre, è stata determinata la presenza di alterazioni fenotipiche delle piantine d'orzo, sia a livello della componente epigea (numero di foglie, lunghezza e larghezza delle foglie) che della parte ipogea (lunghezza delle radici primarie e numero di radici secondarie).

Dall'analisi macroscopica si osserva una modificazione dell'apparato radicale in funzione della concentrazione di cadmio, con la riduzione della lunghezza delle radici primarie e un maggior numero di radici secondarie, risultati confermati anche dalla microscopia elettronica a scansione.

Sono stati misurati importanti parametri eco-fisiologici come la percentuale di inibizione della crescita, il contenuto di acqua (WC), il contenuto di pigmenti fotosintetici (clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi) e il contenuto d'amido. Tali parametri sono stati relazionati con i principali indici fotochimici: massima resa quantica del PSII (F_v/F_m), resa quantica del trasporto elettronico del PSII (QY), attività di trasporto elettronico (ETR) e quenching non-fotochimico (NPQ), allo scopo di valutare l'effetto dei metalli sull'efficienza di conversione della luce ai centri di reazione.

Il cadmio causa, inoltre, una inibizione della crescita con conseguente minore produzione di biomassa, di un minor contenuto d'acqua, di pigmenti fotosintesi e di amido e questi risultati sono collegati alle alterazioni macroscopiche come la minore lunghezza e la maggiore larghezza delle foglie.

La riorganizzazione dell'apparato radicale induce la presenza di una maggior superficie di assorbimento dell'azoto con conseguente incremento dell'attività della nitrato reductasi.

Lo stress non ha effetti verso le proteine Rubisco e D1, confermando che il cadmio influisce nella biosintesi della clorofilla, sui centri di reazione e nella

catena di trasporto degli elettroni del PSII. Tali risultati sono correlati alla presenza di danni ultrastrutturali a livello dei cloroplasti che presentano una disorganizzazione tilacoidale e l'inclusione di briglie citoplasmitiche.

L'attività della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH), sia in foglie che in radici, risulta essere lievemente ridotta dalla presenza degli ioni cadmio anche se i livelli, nelle foglie, della isoforma Cyt della G6PDH rimangono invariati, i livelli dell'isoforma P2 aumentano alla concentrazione $\text{Cd}^{++} 10^{-4} \text{ M}$, mentre i livelli dell'isoforma P1 presentano un andamento contrario rispetto l'isoforma P2; inoltre, non si osservano variazioni significative delle isoforme Cyt e P2 a livello radicale.

Il cadmio induce un severo stress abiotico confermato dall'incremento in funzione dell'aumento di concentrazione del metallo dei livelli delle varie isoforme HSP70 e da una loro diminuzione in funzione del tempo e dell'entità del danno osservato.

Infine, il cadmio induce una evidente variazione del profilo amminoacidico delle piantine stressate.

In conclusione, il cadmio è tra i metalli più tossici per le specie vegetali e sebbene l'orzo rappresenti un organismo coltivato tra i più resistenti agli stress abiotici, sono stati riscontrati danni evidenti sulla sfera micro e macroscopica, fisiologica, ecologica e biochimica.

1. INTRODUZIONE

L'inquinamento da metalli pesanti è uno dei principali problemi degli ecosistemi naturali e rappresenta un grave problema per i paesi industrializzati, dato il loro largo utilizzo in tutte le attività produttive, dall'agricoltura all'industria, al terziario avanzato. L'incremento di tale inquinamento è causato dallo sfruttamento minerario incontrollato, dall'accumulo dei metalli nelle discariche di rifiuti urbani e dalle attività industriali che determinano l'emissione di metalli pesanti particolarmente tossici come cadmio, cromo e piombo (*Parrotta et al., 2015*), responsabili della contaminazione del suolo e delle acque.

I metalli pesanti hanno origine all'interno della crosta terrestre; la loro presenza nel suolo a basse concentrazioni è un prodotto di processi atmosferici e geologici naturali.

Negli ultimi decenni l'accumulo dei metalli pesanti negli organismi vegetali è diventato oggetto di numerosi studi, data l'importanza delle piante nella catena alimentare; in seguito, l'utilizzo di piante come bioindicatori dell'inquinamento da metalli pesanti è diventato una delle metodiche più diffuse per rivelare gli effetti tossici di questo grave tipo di stress (*Esposito et al., 2013*).

L'effetto dell'inquinamento da metalli pesanti su organismi vegetali induce a una condizione di stress, e quindi influenzano i processi di crescita, di sviluppo e di produttività. Gli effetti dell'inquinamento da metalli pesanti dipendono dal

tempo di esposizione, dalla quantità e, naturalmente, dai diversi elementi (*Carginale et al., 2004; Rau et al., 2007*).

Tra i diversi metalli pesanti contaminanti l'ambiente, il cadmio suscita grande preoccupazione, perché è molto tossico per gli organismi viventi e come tale può incidere pesantemente sugli ecosistemi.

Le piante presentano sistemi articolati e dinamici di risposta agli stimoli da stress che sono più complessi di quelli trovati negli animali. La ragione fondamentale di questo è che le piante sono organismi sessili, non hanno la possibilità di spostarsi lontano dalla regione nella quale si determina lo stress, e pertanto , non possono sfuggire da condizioni potenzialmente letali. Questo, in parte, spiega la grande plasticità metabolica delle cellule vegetali, che hanno sviluppato meccanismi che consentono loro di adattarsi e far fronte alle sfide ambientali (*Parrotta et al., 2015*).

Gli stress che le piante subiscono possono essere suddivisi in due grandi categorie: **stress abiotici**, che insorgono all'instaurarsi di un eccesso o da una carenza dei fattori chimici e fisici che determinano le caratteristiche dell'ambiente in cui vive la pianta e gli **stress biotici**, determinati da altri organismi viventi, ad es. patogeni.

I principali stress abiotici sono:

- Temperatura
- Siccità
- Salinità
- Metalli pesanti

Questi stress sono responsabili di gran parte della drastica riduzione della resa nella maggior parte delle colture.

I principali effetti dello stress da metalli pesanti riguardano l'assorbimento dei sali nutritivi e la vitalità dei tessuti verdi con conseguente riduzione dell'efficienza fotosintetica (e quindi con la crescita della pianta).

Le piante sono divise in tre gruppi per la loro capacità di accumulare metalli:

- 1) Gli accumulatori che accumulano metalli principalmente nei loro germogli, sia a basse che alte concentrazioni di metallo nel suolo;
- 2) Gli indicatori, dove la concentrazione di metallo nei tessuti vegetali corrispondenti alla concentrazione nell'ambiente;
- 3) Gli esclusori, che mantengono basse le concentrazioni dei metalli nei loro germogli nonostante è alta la concentrazione esterna dei metalli.

I cereali sono particolarmente esposti agli stress abiotici, essendo piante annuali che concentrano in un breve lasso di tempo la fase di crescita e riproduttiva (produzione dei semi), e data la loro enorme importanza dal punto di vista agroalimentare per l'Uomo, la risposta di queste piante agli stress abiotici riveste un particolare rilievo.

L'orzo, *Hordeum vulgare*, è particolarmente resistente ad alcuni stress abiotici tipici, come la siccità e lo stress salino: esso può quindi rappresentare un organismo modello nella valutazione di risposta allo stress da metalli pesanti.

1.1. I metalli pesanti

I metalli pesanti sono inquinanti ambientali rilevanti, e la loro tossicità è un problema d'importanza crescente a livello ecologico, evolutivo, nutrizionale e ambientale. Il termine "metalli pesanti" si riferisce a qualsiasi elemento metallico che ha una densità relativamente elevata, ed è tossico o velenoso anche a bassa concentrazione.

In particolare, sono definiti metalli pesanti quegli elementi in cui è possibile riscontrare le seguenti caratteristiche:

- Densità maggiore di 5,0 gr/cm³;
- Proprietà cationiche;
- Bassa solubilità dei loro idrati;

- Affinità verso i solfuri;
- Tendenza a formare composti organici;

E' possibile suddividere i metalli pesanti in due categorie:

- **Essenziali**, come rame (Cu), nickel (Ni), ferro (Fe) e zinco (Zn);
- **Non essenziali**, come cadmio (Cd), piombo (Pb), mercurio (Hg) e stagno (Sn);

I metalli pesanti essenziali sono tossici per gli organismi vegetali ad alte concentrazioni, in quanto sono elementi presenti nel metabolismo vegetale, mentre i metalli pesanti non essenziali possono essere tollerati a livelli bassi, ma diventano tossici a concentrazioni più elevate.

I metalli pesanti, inoltre, sono stabili e non possono essere ripartiti, il che rende più facile il loro accumulo nell'ambiente. I metalli pesanti sono maggiormente disponibili in terreni e in ecosistemi acquatici e in una quota relativamente piccola sono presenti in atmosfera sotto forma di particelle o vapori. La loro tossicità nelle piante varia secondo la specie vegetale, del metallo specifico, della sua concentrazione, forma chimica e dalla composizione del terreno e del pH.

I metalli pesanti sono componenti della crosta terrestre, entrano nel mare di solito attraverso afflusso fluviale (dopo eventi atmosferici ed erosione delle

rocce), deposizione atmosferica (particelle di polvere ad esempio dal vulcano) e per le attività antropiche.

Le attività antropiche contribuiscono fortemente sia alla deposizione fluviale (acque reflue di fabbriche) e sia alla deposizione atmosferica (automobili, fabbriche, ecc.).

1.2. Il cadmio

Il cadmio (Cd) fu scoperto quasi contemporaneamente da Friedrich Stromeyer e Karl Hermann nel 1817 in campioni di ossido di zinco ottenuti per combustione del carbonato di zinco dalla Salzgitter (Germania).

Il Cadmio, ione bivalente con una densità pari a 8.6 gr/cm^3 , è un elemento relativamente raro e non si trova in natura allo stato puro. All'aria è rapidamente ossidato in ossido di cadmio e reagisce facilmente con anidride carbonica, vapor d'acqua, anidride solforosa, triossido di zolfo, o cloruro d'idrogeno producendo carbonato, idrossido, solfuro, o cloruro di cadmio; esso stabilisce legami deboli con il carbonio e con altri atomi più elettronegativi.

Il cadmio è ampiamente diffuso in aree con alti livelli d'inquinamento antropogenico; infatti, è rilasciato nell'ambiente da centrali energetiche, impianti di riscaldamento, industrie siderurgiche, inceneritori, traffico urbano, cementifici e come sotto-prodotto dei concimi contenenti fosfati (*Sanità di*

Toppi et al., 1999), ed è uno dei più pericolosi elementi appartenenti al gruppo dei metalli pesanti a causa della sua elevata solubilità.

La presenza del cadmio in atmosfera, nel suolo e nell'acqua, anche se in tracce, può causare seri problemi a tutti gli organismi e il suo bio-accumulo nella catena alimentare può essere altamente dannosa (*Mishra et al., 2004*).

1.3. L'assorbimento del cadmio nelle piante

I metalli pesanti sono resi disponibili alle piante solo in soluzione e non nella loro forma elementare, quindi, è necessario che questi reagiscano prima con altri elementi per essere solubilizzati. Il cadmio è assorbito nelle piante principalmente dal terreno attraverso il sistema radicale (*Sanità di Toppi et al., 1999; Salt et al., 1995*); infatti, sulla superficie della radice, gli ioni cadmio si legano ai gruppi carbossilici degli acidi uronici della mucillagine. Quest'ultima ha la funzione di limitare l'assorbimento del metallo da parte della radice, stabilendo una barriera importante per proteggere l'apparato radicale e in seguito, alcuni di questi ioni legati dalla mucillagine, saranno rilasciati quando la mucillagine sarà biodegradata (*Yang e Pan et al., 2013*). In misura minore, gli ioni cadmio entrano nelle piante anche attraverso le foglie, e la capacità della foglia di assorbire tali ioni dipende notevolmente dalla sua morfologia: foglie lanugineose assorbono i metalli pesanti dall'atmosfera in maniera migliore (*Godzik et al., 1993*).

Tra i vari parametri pedologici che influenzano la disponibilità del cadmio, il pH del terreno è considerato il più importante. Molti studi dimostrano che esiste una tendenza lineare tra il pH del terreno e l'assorbimento del cadmio: la diminuzione del pH del terreno porta ad una concentrazione crescente di cadmio nelle piante (*Kirkham et al., 2006*), quindi, il pH del suolo influisce sulla disponibilità del cadmio presente in soluzione nel suolo ma un aumento del pH del terreno non sempre riduce la quantità di cadmio assorbita dalle piante (*Singh et al., 1995*); infatti, è dimostrato che piante di grano coltivate sulla terra rossa acida in Cina, (pH del terreno = 4,95), il contenuto di cadmio nel grano è di 0,36 mg/kg⁻¹, mentre, a pH di 6,54, il contenuto del cadmio in grano è di 0,43 mg/kg⁻¹ (*Li et al., 2005*). Tra i principali fattori responsabili dell'accumulo di cadmio nel grano non sono solo la quantità di cadmio e il pH, ma anche la quantità di carbonio organico presente nel suolo (*Chaudri et al., 2007*) ed ovviamente anche il genotipo della pianta (*Li et al., 2005*).

L'assorbimento degli ioni cadmio compete con quella di elementi come Zn, P, Cl⁻ (*Li et al., 1994; Zhao et al., 2002; Dheri et al., 2007; Oporto et al., 2009*), Ca (*Choi & Harada et al., 2005*), e Cu (*Kudo et al., 2011*); inoltre, l'aggiunta di agenti chelanti sintetici, come EGTA e EDTA, al terreno contaminato da cadmio, migliora l'assorbimento del metallo pesante da parte della pianta, ottenendo un risultato di pulizia del suolo contaminato (*Salt et al., 1995*).

1.4. Distribuzione del cadmio nei vari organi vegetali

Il cadmio è essenzialmente assorbito dalle radici, ma si localizza in tutti gli organi e tessuti vegetali; in particolare, le foglie rappresentano il sito preferenziale d'accumulo del cadmio, mentre nelle radici si manifesta il massimo assorbimento di cadmio (*Zheljazkov et al., 1996*). Nelle foglie, il cadmio è accumulato in diverse zone, che corrispondono alle parti metabolicamente meno attive, che successivamente andranno incontro a necrosi. Questo suggerisce che esiste nelle piante un metabolismo attivo con la funzione di neutralizzare gli effetti tossici del cadmio, e che l'assenza dei meccanismi di detossicazione induce l'insorgenza di eventi necrotici (*Cosio et al., 2005*); inoltre, l'età delle foglie incide molto nella capacità di accumulare il cadmio, infatti, è accumulato preferibilmente nelle foglie giovani di *Brassica juncea* e *Brassica caerulescens* *Thlaspi*, (*Salt et al., 1995*), mentre in altre specie, il cadmio si accumula nelle foglie senescenti (*Godzik et al., 1993*).

Gli effetti causati dal cadmio vanno dai cambiamenti morfologici, alla riduzione del tasso di fotosintesi a causa della traspirazione ridotta, fino all'apoptosi cellulare (*Souza et al., 2011*). Il cadmio svolge la sua azione tossica anche sulla catena di trasporto degli elettroni fotosintetica determinando squilibri tra il sito donatore ed il sito accettore e riducendo i livelli di proteine coinvolte (*Sigfridsson et al., 2004*).

Il cadmio influenza anche la struttura e la funzione delle radici; infatti, in cellule di cipolla (*Allium cepa*), il trattamento con cadmio induce anomalie, come la vasta vacuolizzazione, la condensazione del citoplasma, danni alle creste mitocondriale, la plasmolisi, e la condensazione della cromatina.

Il contenuto di metalli pesanti nei vari organi della pianta diminuisce secondo il seguente ordine: radici >> foglie-steli >> infiorescenze-semi, ma questa successione può variare con le specie vegetali.

1.5. Distribuzione del cadmio nei tessuti vegetali

Durante la germinazione, il rivestimento del seme rappresenta la prima barriera contro l'assorbimento del cadmio ed è dimostrato che il cadmio si ritrova principalmente nelle pareti cellulari dei tegumenti del seme e non raggiunge gli embrioni, anche quando sono utilizzate concentrazioni letali di cadmio (*Salt et al., 1995*).

Quando le radici assorbono il cadmio, esso si accumula soprattutto nel rizoderma e nella corteccia delle radici (*Vodnik et al., 1999*) e una quantità notevole di cadmio si riscontra a livello dei peli radicali (*Harada et al., 2010*); tuttavia, non si sa se queste strutture sono più o meno importanti per l'assorbimento del metallo pesante (*Seregin et al., 1997*); inoltre, nei siti dove le radici laterali penetrano l'endoderma, il cadmio penetra nella stele più rapidamente (*Akhter et al., 2014*).

La struttura protettiva della corteccia sembra ridurre gli effetti tossici degli ioni cadmio sugli altri tessuti, in quanto, la maggior parte di questi ioni si legano a componenti delle pareti cellulari (acidi poligalatturonici) (*Lux et al., 2010*) e, in tal modo, la corteccia funge da seconda barriera nel difendere le piante dagli effetti tossici del cadmio; infatti, nella maggior parte dei casi, l'accumulo di cadmio nell'endoderma sono inferiori rispetto alla corteccia. In particolare, alle concentrazioni subletali, il cadmio non è presente nella stele (*Seregin et al., 1997*), mentre a livelli prossimi alle concentrazioni letali, gli ioni cadmio attraversano la corteccia e l'endoderma e si trovano in notevoli quantità nelle cellule del cilindro vascolare (*Seregin et al., 1997*). Quindi, la maggior parte del cadmio è localizzato nel rizoderma e nella corteccia e non attraversa la barriera endodermica alle concentrazioni subletali, mentre a concentrazioni letali, questa barriera è rotta e il flusso di cadmio entra nei tessuti della stele (*Akhter et al., 2014*).

Gli studi sulla struttura della barriera endodermica, che limita il trasporto dei metalli pesanti, hanno aiutato a comprendere i meccanismi di resistenza delle piante, a individuare i diversi percorsi che i metalli pesanti utilizzano per raggiungere il germoglio, e a suggerire la distribuzione non uniforme del cadmio nei tessuti vegetali, in funzione dei meccanismi di trasporto.

1.6. Il trasporto del cadmio attraverso la pianta

L'alto contenuto di cadmio nell'apoplasto del rizoderma e della corteccia è presumibilmente dovuto alla traslocazione degli ioni metallici per via apoplastica dal rizoderma all'endoderma, dove la banda del Caspary limita l'ulteriore movimento di tali ioni (*Seregin et al., 1997*). L'endoderma agisce da barriera protettiva precludendo al cadmio di entrare nella stele della radice, ma in aggiunta alle cellule endodermiche, la protezione delle cellule del periciclo si basa anche sulla struttura specifica e sulla composizione delle pareti cellulari del cilindro centrale che forzano gli ioni di cadmio nell'apoplasto delle cellule della stele (*Lux et al., 2010*).

L'assorbimento del metallo nel germoglio è un processo controllato (*Vodnik et al., 1999*): quando il cadmio entra nello xilema con il trasporto radiale, parte degli ioni metallici sono trasportati al germoglio mediante la linfa dello xilema. Nelle radici di pomodoro un possibile veicolante del cadmio potrebbe essere l'acido citrico della linfa xilematica (*Senden et al., 1995*).

Nelle radici di piante di fagiolo, incubate con soluzioni 0,5 e 1 mM di $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, la maggior parte del cadmio è presente come ione Cd^{++} nell'apoplasto; quindi, si presume che è lo ione Cd^{++} che viene trasportato nel germoglio (*Leita et al., 1996*).

La concentrazione di cadmio nella linfa xilematica subisce variazioni stagionali; infatti, nella linfa xilematica di faggio, la concentrazione di cadmio aumenta notevolmente nel mese di aprile, diminuisce a maggio e rimane costante durante i mesi estivi. All'inizio dell'autunno, la concentrazione di cadmio aumenta nuovamente raggiungendo i livelli determinati nel mese di aprile; inoltre, nel mese di novembre e marzo, il gradiente di cadmio scende dall'alto verso la base del tronco, mentre a maggio, il contenuto massimo di cadmio si ritrova nel mezzo del tronco e il contenuto di cadmio nella linfa xilematica può indurre un avvelenamento del parenchima dello xilema (*Glavac et al., 1990*).

Oltre al trasporto dei metalli pesanti a lunga distanza, tramite lo xilema, una parte del trasporto avviene mediante il floema; infatti, in piante di arachide è dimostrato, le cui radici e baccelli sono sommersi in soluzioni a diverse concentrazioni di cadmio, che solo il 18% del cadmio raggiunge direttamente i baccelli rispetto al 82% trasportato tramite le radici e che la maggior parte del cadmio è spostato nei baccelli attraverso il floema (*Popelka et al., 1996*).

I tassi di assorbimento e di trasporto del cadmio variano con le specie vegetali, (*Evlard et al., 2014b; Yamaguchi et al., 2011; He et al., 2013; Xing et al., 2008*) e quindi utile determinare la tolleranza della pianta al metallo pesante stesso. Il tasso più basso di trasporto del cadmio verso il germoglio si ritrova nel loglio (*Lolium perenne*), mentre si osservano i più alti tassi di assorbimento e di trasporto del cadmio nelle piante di trifoglio ladino (*Yang et al., 1995*).

La velocità di trasporto del metallo dipende anche dalla presenza di altri metalli; infatti, il calcio aumenta il trasporto di cadmio nelle radici del salice, e nella betulla.

1.7. Localizzazione intracellulare del cadmio

Concentrazioni relativamente elevate di cadmio sono riscontrate nella parete cellulare in molte specie (*Seregin et al., 1997; Lux et al., 2010*).

Le pareti cellulari delle piante monocotiledoni e dicotiledoni si differenziano per il contenuto pectina ed emicellulosa, e questo fattore influisce sulla loro capacità vincolante verso i cationi (*Lux, 2010*).

I metalli pesanti favoriscono la deposizione di callosio e di suberina che frena l'assorbimento dei metalli pesanti stessi (*Schreiber et al., 1999; Samardakiewicz et al., 1996; Piršelová et al., 2012*) e le pareti cellulari possono impedire il trasporto di cadmio nel citoplasma; una parte considerevole di metalli pesanti assorbiti rimane sulla superficie esterna del plasmalemma sotto forma di aggregati globulari (*Wierzbicka et al., 1984*), tuttavia, parte degli ioni cadmio viene assorbita e raggiunge il citoplasma.

Gli ioni cadmio entrano nelle cellule mediante trasporto passivo, ma l'assorbimento attivo è apparentemente collegato alla competizione del cadmio con altri metalli verso i trasportatori di membrana e i canali ionici (*Salt et al., 1995*). All'interno della cellula, molti ioni cadmio si accumulano nei vacuoli e

insieme alla parete cellulare comprendono fino al 96% del metallo assorbito. La deposizione del cadmio nel vacuolo avviene in forma di complessi e sali ed elimina il cadmio dal citoplasma e rappresenta, quindi, un meccanismo di detossificazione (*Mazen et al., 1997*).

Comprendere i meccanismi di trasporto dei metalli pesanti assorbiti verso il vacuolo è importante per la comprensione del concetto di tolleranza della pianta. Innanzitutto, gli ioni cadmio dalla soluzione esterna possono entrare immediatamente nel reticolo endoplasmatico collegato all'apoplasto (*Gamalei et al., 1997*); in secondo luogo, nel vacuolo, l'accumulo di composti a elevata affinità verso metalli pesanti, come gli acidi organici e i composti che formano complessi a bassa solubilità con metalli pesanti, determinano la localizzazione predominante dei metalli pesanti in questo organello (*Mazen et al., 1997*).

Terzo, il sequestro del cadmio può dipendere dalla sintesi nel citoplasma di fitochelatine (PC) (*Carrier et al., 2003*). Il ruolo delle fitochelatine nel trasporto del cadmio è stato studiato nei minimi dettagli nei vacuoli di protoplasti isolati da mesofillo di tabacco; in particolare, in seguito a trattamento con 20 mM di CdCl_2 , il contenuto di glutatione e di fitochelatine nei vacuoli aumenta (*Vogel-Lange et al., 1990, 1996*); inoltre, gli ioni cadmio inducono la sintesi di peptidi Cd-sequestranti nel citoplasma o nei cloroplasti. I complessi metallo-peptide, così prodotti, sono trasportati nei vacuoli. A pH inferiore della linfa vacuolare, questi complessi si dissociano e i peptidi sono degradati da proteasi vacuolari e

lasciano vacuolo. Quindi, i peptidi lavorano come navette per il trasporto del cadmio nel vacuolo, dove gli ioni cadmio si legano agli acidi organici e aminoacidi della linfa vacuolare (*Vogeli-Lange et al., 1996*).

Una piccola quantità di cadmio raggiunge i nuclei, cloroplasti e mitocondri ed esercita effetti tossici su questi organelli.

Riassumendo, la porzione maggiore di cadmio è legata agli acidi poligalatturonici della parete cellulare e ai vari ligandi nel vacuolo (*Lux et al., 2010; Carrier et al., 2003*). Tale legame abbassa la concentrazione del metallo nel citoplasma. L'esclusione efficiente del cadmio dal citoplasma attraverso il suo accumulo nei vacuoli o la traslocazione verso tessuti senescenti può essere cruciale per la tolleranza della pianta ai metalli pesanti.

1.8. Effetti del cadmio sulle attività enzimatiche

Quando il cadmio interagisce con gli enzimi, in genere, inibisce le loro attività. In particolare, il cadmio induce il 50% d'inibizione in un range di concentrazioni che vanno da 10^{-6} a 3×10^{-5} M (*Kositsin et al., 1991*). Questo range di concentrazione è definito come costante d'inattivazione (K_i). Ad esempio, il cadmio inibisce l'attività della fosfatasi alcalina nel range di 10^{-8} a 10^{-3} M, e questa proprietà del cadmio è utilizzata nella chimica analitica per determinare il contenuto di cadmio disciolto.

Il contenuto libero di cadmio nel citoplasma è tra 10^{-6} e 10^{-5} M, un livello sufficiente a inibire la maggior parte delle attività enzimatiche.

Nella maggior parte dei casi, l'inibizione esercitata dal cadmio, è il risultato dell'interazione tra gli ioni cadmio e i gruppi -SH essenziali per il centro di reazione e per la stabilizzazione della struttura terziaria dell'enzima.

L'interazione di questi ioni con i gruppi -SH induce l'inibizione dell'attività di oltre 100 enzimi conosciuti. Il cadmio può anche promuovere diverse attività enzimatiche, anche se non è chiaro se il cadmio influenzi direttamente le attività enzimatiche, o se tale stimolazione è il risultato di cambiamenti nella sintesi degli enzimi; oppure determinato dall'immobilizzazione di inibitori.

Il cadmio promuove la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (*Benavides et al, 2005*; *Cho & Seo, 2005*; *Gratão et al, 2005*); in risposta allo stress ossidativo vi è un aumento delle attività enzimatiche antiossidanti che hanno lo scopo di neutralizzare i radicali liberi e perossidi (*Uraguchi et al., 2009*).

La resistenza di uno stesso enzima verso i metalli pesanti varia da specie a specie vegetale: infatti, il cadmio esercita l'inibizione dell'antiporto H^+/K^+ (*in vivo*) e le attività ATPasiche diminuiscono secondo il seguente ordine: cavolo > zucca > pesca > riso > fagiolo (*Obata et al., 1996*). Quindi, la maggior parte delle attività enzimatiche diminuisce in seguito al contatto con gli ioni cadmio, e questo aspetto è fondamentale per la comprensione degli effetti multidirezionali

di questi ioni sui diversi aspetti del metabolismo cellulare. L'inibizione esercitata dal cadmio non è specifica, ed è prodotta anche da altri cationi con affinità di legame sovrapponibile a quella del cadmio per i gruppi funzionali delle proteine, ma in alcuni casi, tuttavia, il cadmio promuove le attività enzimatiche, come la stimolazione diretta della catalasi, della perossidasi e della superossido dismutasi (*Uraguchi et al., 2009*).

1.9. Effetti del cadmio sull'assorbimento dei minerali

L'assorbimento, il trasporto e la successiva distribuzione degli elementi nutritivi da parte delle piante possono essere influenzati dalla presenza del cadmio. In generale, il cadmio interferisce con l'assorbimento, il trasporto, e l'uso di diversi elementi come il Ca, il Mg, il P, il K e l'acqua dalle piante (*Das et al., 1997; Choi & Harada et al., 2005; Dheri et al., 2007*).

Nella barbabietola da zucchero esposta al cadmio si osserva una carenza di Ferro a livello radicale (*Chang et al., 2003*). Nelle piante di pisello, l'assorbimento di P, K, S, Ca, Zn, Mn e B è inibito fortemente dopo l'esposizione con il cadmio (*Metwally et al., 2005*). Il trattamento di piante di orzo con 1,0 mM di cadmio riduce le concentrazioni di P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, e B nelle radici, mentre le concentrazioni di questi elementi nei germogli non erano diminuite rispetto al controllo (*Guo et al., 2007*). Una diminuzione della diffusione di Ca e di K è riscontrato anche in *Atriplex halimus* (*Nedjimi & Daoud, 2009*); inoltre, il cadmio riduce l'assorbimento di nitrato e il suo trasporto dalle radici alle

germogli, inibendo l'attività della nitrato reduttasi nei germogli (*Hernandez et al., 1996*). L'inibizione, la fissazione e l'assimilazione di ammoniaca primaria è diminuita nei noduli di piante di soia durante i trattamenti con il cadmio (*Karina et al., 2003*).

In che modo il cadmio inibisca l'assorbimento degli altri elementi non è ancora del tutto chiaro. In mais, il trattamento con cadmio induce una inibizione dell' H^+ -ATPasi nelle cellule della radice. L' H^+ -ATPasi funge da trasportatore di ioni attraverso il plasmalemma, quindi, il cadmio riducendo l'attività dell' H^+ -ATPasi, inibisce l'assorbimento di alcuni elementi essenziali (*Astolfi et al., 2005*). Inoltre, è dimostrato che in pioppo (*Populus jaquemontiana* var. Glauca) il cadmio può inibire l'assorbimento dei minerali attraverso una competizione nel processo di assorbimento (*Solti et al., 2011*).

1.10. Effetti del cadmio sul regime idrico

Il cadmio induce un declino del tasso di traspirazione e del contenuto di acqua nelle piante trattate (*Vassilev et al., 1997*).

Diversi meccanismi sono alla base di questi effetti:

- 1) Il ritardo della crescita delle foglie, il principale organo traspirante (*Barcelo et al., 1988*);
- 2) Le dimensioni delle cellule di guardia che qualche volta sono più piccole nelle piante trattate con cadmio, mentre in altri casi, le cellule di guardia

sono relativamente più numerose, perché questi metalli pesanti influiscono sulla crescita della foglia ma in misura maggiore nella differenziazione degli stomi;

- 3) Il cadmio abbassa il contenuto dei composti responsabili del mantenimento del turgore cellulare e della plasticità della parete cellulare e quindi, riducono il potenziale idrico (*Hernandez et al., 1997; Vassilev et al., 1997; Leita et al., 1995*);
- 4) Questi metalli aumentano il contenuto di ABA, inducendo così la chiusura degli stomi (*Hollenbach et al., 1997*). Il cadmio, influenzando il metabolismo dell'ABA, promuove nell'epidermide l'espressione del gene che codifica per le proteine coinvolte nel trasferimento non specifico dei lipidi. A sua volta, quest'ultimo effetto porta all'accumulo di monomeri costituenti la cutina nel sito di sintesi di questa biomolecola che induce l'aumento dello spessore della cuticola, ostacolando così la traspirazione (*Hollenbach et al., 1997*);
- 5) La alterazione provocata dal cadmio nella respirazione cellulare e nella fosforilazione ossidativa, può indurre un deficit idrico nella pianta, promuovendo la produzione di prolina (*Schat et al., 1997*), un osmoregolatore fortemente coinvolto nella risposta agli stress abiotici (*Kuznetsov et al., 1999*).

1.11. Effetti del cadmio sulla respirazione cellulare

Presumibilmente, il cadmio inibisce il trasporto degli elettroni e di H^+ nei mitocondri e disorganizza quindi la catena di trasporto degli elettroni (*Alia Saradhi et al., 1993; Kessler et al., 1994; Heyno et al., 2008*).

Il cadmio non influisce direttamente sul processo della glicolisi e della via dei pentosi fosfati, ma inibisce l'ossidazione del succinato attraverso il ciclo di Krebs, suggerendo che il complesso della succinato deidrogenasi mitocondriale è un obiettivo primario degli ioni cadmio (*Reese et al., 1985*). Tuttavia, in letteratura vi sono risultati che dimostrano l'inibizione esercitata dal cadmio, sia *in vitro* che *in vivo*, degli enzimi chiave della glicolisi e della via dei pentosi fosfati (*Chugh et al., 1999*).

1.12. Effetti del cadmio sulla fotosintesi

L'accumulo di cadmio a livello del parenchima fotosintetico può avere ripercussioni sia sui processi della fase luminosa che sulle reazioni della fase oscura; infatti, è stato dimostrato che in molte specie, come la *Brassica napus* (*Baryla et al., 2001*), l'*Helianthus annuus* (*Di Cagno et al., 2001*), la *caerulescens Thlaspi* (*Kupper et al., 2007*), l'*Hordeum vulgare* (*Popova et al., 2008*), la *Vigna irradiale* (*Wahid et al., 2008*), e il *Triticum L.* (*Moussa & El-Gamal, 2010*), la fotosintesi risulta significativamente inibita dopo l'esposizione al cadmio sia a lungo che a breve termine.

Tra i vari complessi multiproteici immersi nella membrana tilacoidale, il fotosistema II (PSII) risulta essere particolarmente sensibile all'azione del cadmio (*Sigfridsson et al., 2004*) sia a livello del sito riducente (accettore) che a livello del sito ossidante (donatore); inoltre, è stato dimostrato che l'accumulo di cadmio danneggia la struttura dei centri di reazione e dei trasportatori di elettroni, compromettendo la funzionalità dell'intero trasporto elettronico fotosintetico. Altro bersaglio della contaminazione da cadmio è il complesso della Ferrodossina-NADP⁺-reduttasi che inattivandosi comporta danni anche al fotosistema I (PSI) (*Siedlecka e Baszynki, 1993; Sárvári et al., 1999*).

Gli effetti deleteri del cadmio sulla fotosintesi si evidenziano anche al livello di ultrastruttura. Infatti, foglie contaminate da cadmio mostrano una ultrastruttura distorta dei cloroplasti, in cui appaiono bene evidenti alterazioni nella sintesi di clorofilla, di plastochinoni, e di carotenoidi; inoltre, quando lo sviluppo dei plastidi è direttamente influenzata dal cadmio, si osservano anche alterazioni delle membrane i cui cambiamenti in composizione lipidica ed acidi grassi determinano una riduzione della funzionalità (*Ouariti et al., 1997; Sersen & Kral'ova, 2001; Popova et al., 2009*).

La riduzione del contenuto di clorofilla, in particolare di clorofilla b, è un tipico effetto del cadmio (*Vodnik et al., 1999*), ed è imputabile all'inibizione di enzimi responsabili della sintesi della clorofilla e alla mancanza di magnesio e ferro. La

diminuzione del contenuto di pigmenti, indotta dal cadmio, è maggiore sulla superficie fogliare (cellule di guardia stomatiche) rispetto al mesofillo.

Lo stress da cadmio può essere anche responsabile di cambiamenti di dimensione delle cellule, e della riduzione della densità di stomi. Il cadmio, inoltre, può interferire direttamente a livello strutturale, minando la divisione cellulare nel tessuto fogliare e a livello funzionale, compromettendo gli scambi gassosi attraverso una riduzione della conduttanza stomatica.

L'effetto di una stessa concentrazione di cadmio sul contenuto di clorofilla varia nelle diverse specie vegetali. Ad esempio, con soluzioni 9 μM di cadmio il contenuto di clorofilla diminuisce drasticamente nelle giovani foglie di *B. juncea* mentre non induce variazioni nelle foglie di *T. caerulescens* (Salt et al., 1995).

L'inibizione della sintesi della clorofilla da parte degli ioni cadmio è spesso associata a fenomeni di clorosi ma secondo Barylá et al., (2001), la clorosi osservata nella *Brassica napus* non è dovuta ad una interazione diretta del cadmio con le vie biosintetiche della clorofilla, ma probabilmente è causata dalla diminuzione della densità dei cloroplasti.

E' riconosciuto che il cadmio espleta la sua azione tossica principalmente su due enzimi chiave del processo fotosintetico: la ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi-ossigenasi (Rubisco) e la fosfoenolpiruvato carbossilasi (PEPCase); in particolare, gli ioni cadmio riducono l'attività della Rubisco, danneggiandone la

struttura con la sostituzione degli ioni magnesio, importanti cofattori della reazione di carbossilazione, e spostando l'attività della Rubisco verso reazioni di ossigenazione (*Siedlecka et al., 1998*).

1.13. Effetti del cadmio sulla crescita e sulla morfogenesi delle piante

Tutti i cambiamenti metabolici prodotti dal cadmio modificano drasticamente la crescita e lo sviluppo delle piante; infatti, le distorsioni morfogenetiche sono un sintomo non specifico degli effetti esercitati da diversi fattori di stress, utili per valutare la fitotossicità di questi fattori.

La valutazione dell'inibizione di crescita nelle piante è spesso usato come parametro nei test ambientali per valutare la presenza dei metalli pesanti come il cadmio. Tale inibizione di crescita da metalli pesanti è il risultato di disturbi del metabolismo e degli effetti diretti sulla crescita, per esempio, le interazioni del cadmio con i polisaccaridi della parete cellulare causano una diminuzione della plasticità delle cellule (*Lux et al., 2010*).

La germinazione dei semi rappresenta una fase dello sviluppo delle piante più tollerante ai metalli pesanti (*Obroucheva et al., 1998*), mentre la crescita delle radici è più sensibile al cadmio rispetto alla crescita del germoglio (*Obroucheva et al., 1998; Seregin et al., 1997*). Questa evidenza è correlata con il risultato che i metalli pesanti si accumulano prevalentemente nell'apparato radicale; in particolare, a basse concentrazioni, il cadmio promuove la crescita del sistema radicale (*Hagemeyer et al., 1996*), mentre ad alte concentrazioni inibisce la

crescita delle radici e tali effetti inibitori non si osservano entro i primi 3 giorni d'esposizione (*Obroucheva et al., 1998*).

Il cadmio altera la morfologia dell'apparato radicale, poiché, a concentrazioni moderate, il numero di radici laterali diminuisce in misura minore rispetto alla lunghezza della radice primaria, e il sistema radicale acquisisce una strutturazione densa. La formazione di radici laterali, infatti, è un processo molto tollerante ai metalli pesanti, probabilmente a causa della barriera endodermica e della struttura specifica delle cellule nel cilindro centrale (*Obroucheva et al., 1998*). I sistemi radicali a strutturazione densa si sviluppano quando i metalli pesanti diminuiscono la dimensione delle cellule allungate e quindi le distanze tra i vari sviluppi delle radici laterali.

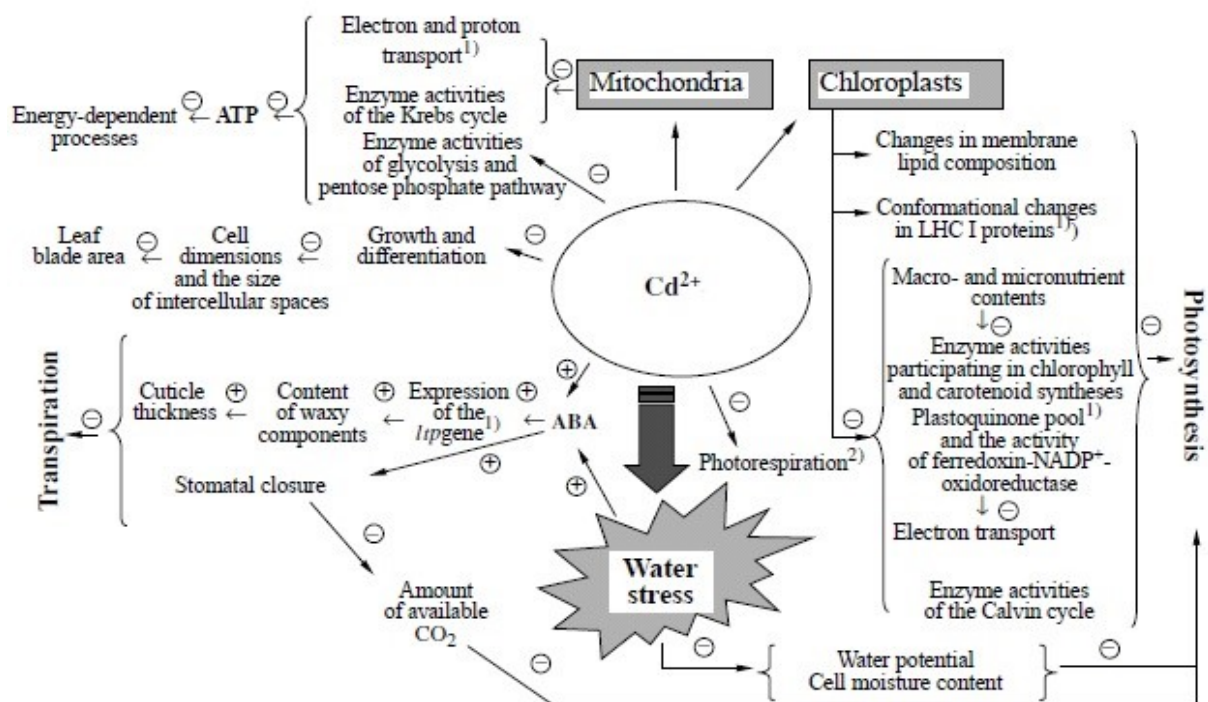


Fig. N°1: Effetti del cadmio sulla fotosintesi, la respirazione e sul regime idrico.

1.14. Meccanismi di risposta allo stress da cadmio a livello cellulare

Anche se il cadmio è un contaminante tossico degli ecosistemi, le piante hanno evoluto meccanismi di risposta alla contaminazione da cadmio del suolo; inoltre, i dati indicano che un meccanismo universale di tolleranza al cadmio non è presente e che diverse piante, spesso strettamente correlate, rispondono in modo diverso quando esposti al cadmio.

La tossicità del cadmio è spesso ridotta attraverso il suo sequestro in specifici compartimenti cellulari, come ad esempio vacuoli, o all'interno di cellule specializzate, come i tricomi (*Harada et al., 2010*); inoltre, l'adattamento delle piante verso terreni contaminati da cadmio migliora mediante la collaborazione simbiotica con altri organismi. In *Medicago sativa*, la colonizzazione delle radici da parte di micorrize arbuscolari aumenta la tolleranza delle piante verso il cadmio. È probabile che i funghi possiedano un insieme di attività enzimatiche e/o meccanismi in grado di modificare chimicamente il cadmio rendendolo così meno tossico (*Wang et al., 2012*).

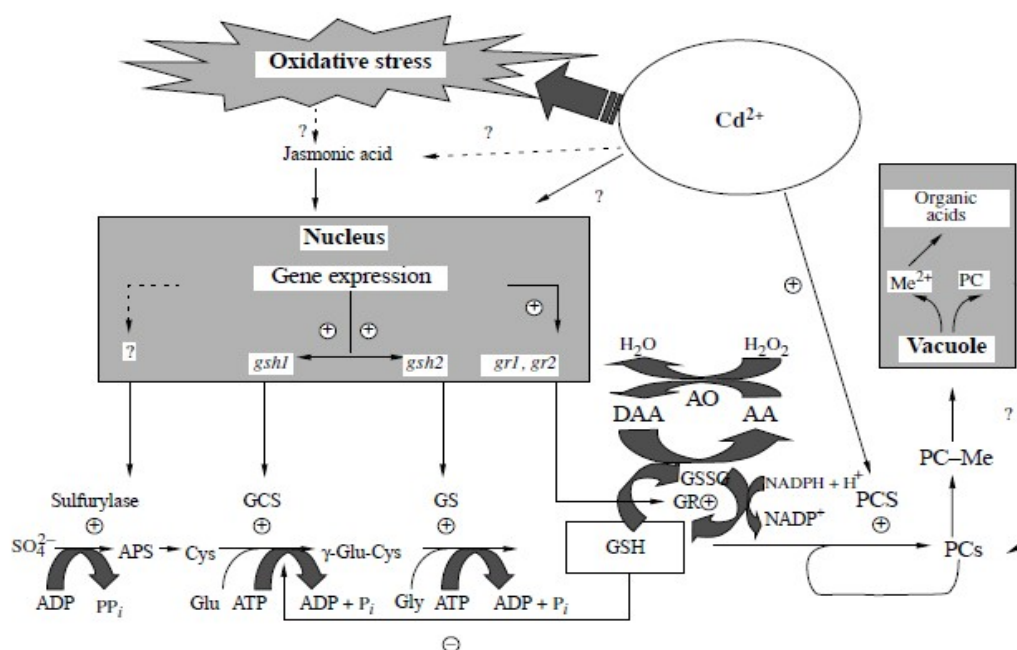
La parete cellulare agisce efficacemente nel bio-accumulo del cadmio, riducendo gli effetti tossici del metallo pesante. Il meccanismo di protezione basato sulla parete cellulare è solo uno dei processi utilizzati dalle piante per far fronte al danno indotto dal cadmio. Oltre la parete cellulare, vi sono altri meccanismi protettivi contro la tossicità del cadmio che partecipano a risposte biochimiche e al sequestro intracellulare del cadmio.

Numerosi studi dimostrano che, entrando nella cellula, gli ioni cadmio si legano a piccoli peptidi contenenti cisteina denominati fitochelatine (PC) mediante i loro gruppi –SH. Questi composti formano complessi contenenti cadmio di circa 3,6 kD. La struttura base di questi peptidi è $[\gamma\text{-glutamminil-cisteinil}]_n\text{-glicina}$, con $n = 2-11$ (Carrier *et al.*, 2003).

La produzione di fitochelatine coincide con l'attivazione del metabolismo dello zolfo; infatti, aumenta la sintesi della cisteina e del glutathione ridotto (GSH), un antiossidante precursore di fitochelatine (Zhang e Shu *et al.*, 2006). L'importanza dello zolfo nella biosintesi delle proteine sulfidriliche, suggerisce che un maggior contenuto di zolfo genera grandi quantità di proteine in grado di sequestrare il cadmio nel citosol, riducendo così l'accumulo del metallo nella parete cellulare (Zhang *et al.*, 2014c). Pertanto, la disponibilità di zolfo può controllare la velocità di sintesi di queste proteine (Loeffler *et al.*, 1989; Uegsegger *et al.*, 1990).

La presenza di fitochelatine nella detossificazione delle piante sottoposte a stress da cadmio è considerata un meccanismo importante e sembra essere organo-dipendente; infatti, si è osservato che nelle radici iperaccumulatrici del *Sedum alfredii* questo meccanismo basato sulle fitochelatine è poco utilizzato, mentre nei germogli della stessa pianta questo processo è utilizzato (Zhang *et al.*, 2010b).

Un'altra classe importante di proteine ricche di cisteina che legano i metalli pesanti nelle piante e negli animali sono le metallotionine (MTS). Il loro ruolo nello stress da metalli pesanti nelle piante è conosciuto e il loro potenziale uso nel campo delle biotecnologie è supportata da recenti studi che hanno analizzato gli effetti della sovraespressione delle MTS in *Arabidopsis thaliana* e tabacco (Gu et al., 2014; Zhou et al., 2014). Le piante trasformate hanno mostrato un aumento della tolleranza allo stress da cadmio, che è accompagnata da un minore accumulo di H_2O_2 in *A. thaliana* e di una maggiore attività di rimozione dei ROS nel tabacco.



1.15. Il cadmio e la produzione delle specie reattive dell'ossigeno

I metalli pesanti causano danni ossidativi alle piante, direttamente o indirettamente, attraverso la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Alcuni metalli pesanti, come rame e ferro, possono essere tossici attraverso la loro partecipazione nei cicli redox come le reazioni Fenton e / o Haber-Weiss. Al contrario, il cadmio è un metallo non-redox e non produce ROS quali l'anione superossido (O_2^-), l'ossigeno singoletto (1O_2), il perossido d'idrogeno (H_2O_2), e il radicale idrossile (OH^-), ma genera lo stress ossidativo, interferendo con il sistema di difesa antiossidante (*Benavides et al, 2005; Cho & Seo, 2005; Gratão et al, 2005*).

Il cadmio inibisce la fotoattivazione del fotosistema II (PSII) inibendo il trasferimento di elettroni. Così, il cadmio potrebbe portare alla generazione di ROS indirettamente mediante la produzione di un disturbo nei cloroplasti. Inoltre, altri studi suggeriscono che il cadmio può stimolare la produzione di ROS nella catena di trasferimento degli elettroni mitocondriali (*Heyno et al., 2008*). In piante di piselli e riso trattate con cadmio si osserva la stimolazione della NADPH ossidasi legata alla membrana dei perossisomi che quindi genera ROS. L'attivazione del processo di generazione dei ROS è veloce: in piantine di pino silvestre (*Pinus sylvestris*) esposte a cadmio 50 mM vi è aumento dei ROS in 6 ore; in *Medicago sativa* l'esposizione al cadmio per 6-24 h causa un rapido accumulo di perossidi e una riduzione del glutathione (GSH) e dell'omoglutatione

(hGSH), portando a uno squilibrio redox. La morte cellulare indotta dal cadmio, in cellule di tabacco, è preceduta dall'accumulo di H_2O_2 prodotta dalla NADPH-ossidasi, seguita dall'accumulo cellulare di O_2^- e di acidi grassi ossidati dall'idroperossido (Gill & Tutela et al., 2010). I danni causati nelle piante dai ROS sono la perossidazione lipidica, la perossidazione di proteine, e danni al DNA. Il cadmio produce un aumento della perossidazione lipidica in *Phaseolus vulgaris* (Chaoui et al., 1997), *Helianthus annuus* (Gallego et al., 1996), e *Pisum sativum* (Lozano-Rodriguez et al., 1997).

I danni al DNA causati dal cadmio causano un danneggiamento dell'apparato fotosintetico, ma anche la distruzione degli acidi nucleici, dei lipidi della membrana cellulare, delle proteine e una riduzione della sintesi proteica influenzando di conseguenza la crescita e lo sviluppo di tutto l'organismo. I danni al DNA sono stati definiti mediante la determinazione delle frequenze di anomalia, come la presenza di frammenti, la separazione precoce o ritardata, la presenza di singoli o doppi ponti, e la viscosità del materiale genetico (Gill & Tuteja, 2010; Kranner & Colville, 2011). Molte proteine con attività enzimatica hanno la funzione di ridurre la presenza delle ROS, come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), l'ascorbato perossidasi (APX), la monodeidroascorbato reduttasi (MDHAR), la deidroascorbato reduttasi (DHAR), la perossidasi (POD), e la glutathione reduttasi (GR); ma anche molecole più semplici come il glutathione (GSH); infatti, SOD, GR, APX, POD,

e CAT mostrano variazioni nelle loro attività che dipendono dalle specie vegetali e dalle concentrazioni di cadmio adoperate (*Sandalio et al., 2001; Yilmaz and Parlak et. al., 2011; Gill & Tuteja, et al., 2010;*). Le attività della MDHAR e della DHAR aumentano in piante di senape esposte a 10 μM di cadmio (*Markovska et al., 2009*). Un aumento dei livelli di GSH, che porta a una maggiore attività antiossidante contro la tossicità del cadmio, è ritrovata nelle foglie e nei cloroplasti di *Phragmites australis*. Inoltre, l'accumulo di grandi quantità di osmoliti, come la prolina, è una risposta adattativa delle piante esposte ad un ambiente stressante e l'accumulo di prolina sembra essere un indicatore adeguato per lo stress da metalli pesanti (*L'Islam et al., 2009*).

1.16. Il cadmio e la produzione delle Heat Shock Proteins

La risposta di piante al cadmio richiede l'attivazione di enzimi in grado di ripiegare le proteine, in quanto uno degli effetti intracellulare più drammatici causati dal cadmio è la denaturazione proteica. Queste proteine sono denominate proteine da shock termico (HSP) (*Timperio et al., 2008*) e i loro livelli incrementano dopo il trattamento con il cadmio (*Esposito et al., 2007*).

Molte classi di HSP sono state trovate nelle piante tra le quali HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e small HSP (con un peso molecolare compreso fra 17 e 30 kDa);

In colture cellulari di *Lycopersicon peruvianum*, esposte a 1 mM Cd_2^{++} , una notevole quantità di HSP70 sono ritrovate legate al plasmalemma, alle

membrane mitocondriali e del reticolo endoplasmatico (*Neumann et al., 1994*). Questo sembra essere correlato alla formazione di complessi tra il cadmio e le proteine denaturate dal cadmio stesso. La proteina HSP70 aiuta le proteine ripiegate in maniera errata a trovare la loro conformazione nativa, reintegrandole all'interno del complesso della membrana. L'esposizione al cadmio causa una denaturazione delle proteine in *Saccharomyces cerevisiae* (*Jungmann et al., 1993*), e un aumento dei livelli di HSP70 sono state rilevate anche in *Conocephalum conicum* e *Lemna minor* esposti al cadmio, suggerendo che la necessità di ripiegare proteine è un prerequisito per mantenere l'attività cellulare durante lo stress da metalli pesanti (*Basile et al., 2013 and 2015*); inoltre, è stata determinata, in mais e orzo, la struttura del gene Hvhspl7 codificante le HSP, e l'espressione di questo gene aumenta in presenza di cadmio (*Sanità di Toppi et al., 1999*).

1.17. Il cadmio e la sintesi di etilene

L'etilene, un fitormone gassoso, è prodotto dalla metionina in tutte le piante superiori e svolge un ruolo chiave in molti i processi come la crescita delle piante, lo sviluppo, la fotosintesi, la senescenza e la maturazione dei frutti (*Bleecker e Kende et al., 2000*). Tuttavia, l'etilene gioca un ruolo anche nella tolleranza/adattamento delle piante ad una serie di stress abiotici, tra cui quello indotta dai metalli pesanti (*Montero-Palmero et al., 2013; Asgher et al., 2014. Khan e Khan et al., 2014*).

Durante lo stress da cadmio, l'etilene potrebbe agire come un segnale di:

- Un accelerato processo di lignificazione (*Ievinsh e Romanovskaya et al., 1991*), attraverso l'incremento dell'attività degli enzimi fenilalanina-liasi e perossidasi;
- Un'induzione dell'attività dell'ascorbato perossidasi, necessaria per avviare il processo di detossificazione del perossido d'idrogeno;
- Una regolazione di espressione dei geni codificanti le metionine e/o proteine antistress (*Whitelaw et al., 1997*);

Potrebbe essere possibile, quindi, che l'etilene interagisca con il cadmio e con gli altri metalli di transizione (zinco o rame) (*Scheller et al., 1996*) e/o con il metabolismo del glutathione con conseguente influenza sulla sintesi delle fitochelatine.

1.18. Il cadmio e l'omeostasi cellulare

L'assorbimento di metalli pesanti attiva i vari sistemi di protezione che devono mantenere l'omeostasi cellulare. Tutti questi meccanismi di protezione, che si attivano in condizioni di stress, hanno lo scopo di garantire la sopravvivenza delle piante e il loro adattamento all'insorgere di un mutamento ambientale. La maggior parte di questi meccanismi non sono specifici e sono presenti in tutte le risposte da stress che sono causate da vari agenti ma in funzione del tipo di stress differiscono nell'intensità delle risposte.

Questi sistemi includono:

- 1) L'attivazione di enzimi stress, come catalasi, perossidasi e superossido dismutasi;
- 2) La superproduzione di osmoliti in risposta allo stress indotto dal metallo;
- 3) Cambiamenti nelle proprietà fisico-chimiche delle pareti cellulari;
- 4) Sintesi delle poliammine (*Groppa et al., 2001*);
- 5) Cambiamenti nell'equilibrio ormonale;
- 6) La sintesi di composti in grado di sequestrare i metalli e proteine da stress;

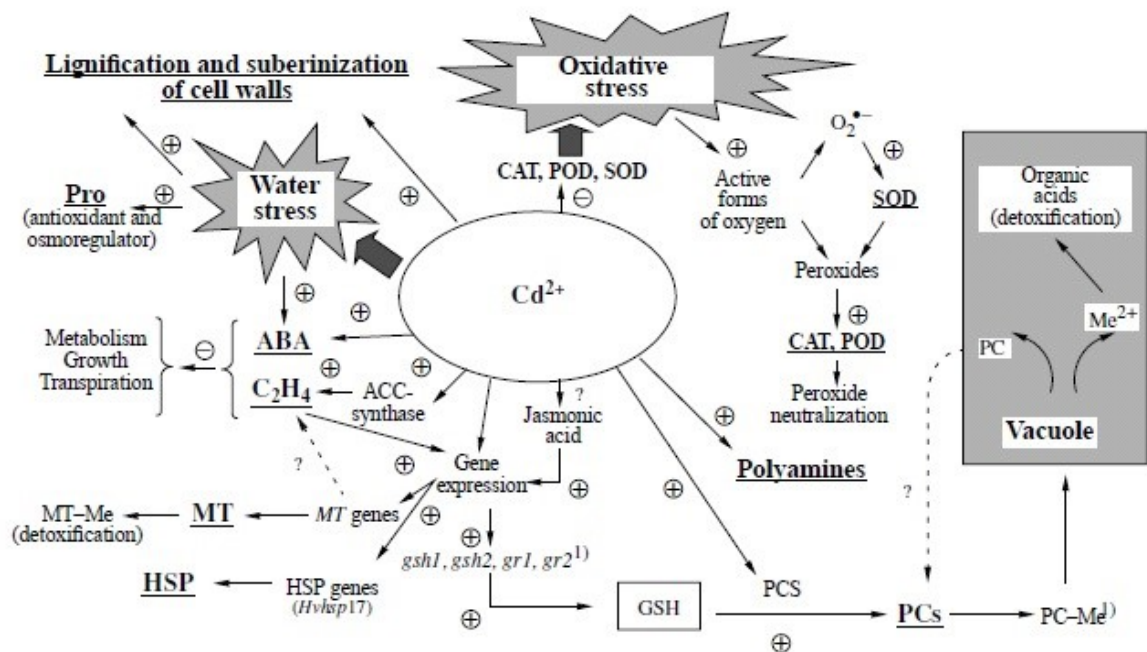


Fig. N°3: Meccanismo di risposta cellulare agli effetti tossici del cadmio.

1.19. *Hordeum vulgare*

L'orzo (*Hordeum vulgare*), è una graminacea diploide ($2n = 14$ cromosomi) appartenente alla Tribù delle *Hordeae*, Gen. *Hordeum*; essa è una pianta erbacea annuale, che a maturità può raggiungere un'altezza di 60-120 cm.

È una specie caratterizzata da una notevole importanza dal punto di vista economico, in quanto rappresenta uno dei più importanti cereali coltivati nel mondo.

L'orzo viene attualmente utilizzato per l'alimentazione del bestiame, per la produzione di malto e per l'industria della torrefazione e la sua coltivazione è diffusa in tutto il mondo (Giardini *et al.*, 2000). È il quarto cereale in ordine d'importanza, dopo frumento, riso e mais (Giardini *et al.*, 2000). I semi germinano ad una temperatura minima di 5 °C, la temperatura ottimale per la crescita è di 15 °C, mentre 17 – 18 °C sono idonei per la fioritura.

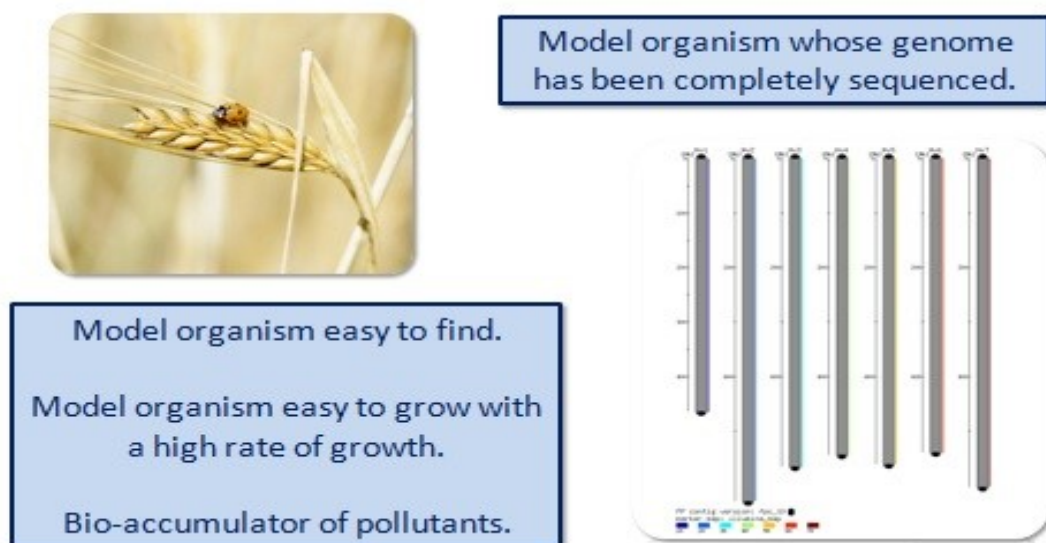


Fig. N°4: Caratteristiche dell'orzo.

1.20. Caratteri morfologici

L'orzo è una pianta caratterizzata da un culmo cilindrico con internodi cavi presenti in numero variabile da 5 ad 8. Gli internodi basali sono generalmente più corti e sono divisi da un setto trasversale. Il culmo presenta lunghezza variabile: si parte dai 15 cm di alcune forme selvatiche sino a raggiungere i 150 cm di certe varietà; in genere ogni pianta forma più culmi, uno principale e due o tre accestimenti. Le foglie sono alterne, presentano lunghe auricole (a differenza degli altri cereali microtermi), una ligula non appariscente, e sono caratterizzate da una lamina liscia nella pagina inferiore, mentre in quella superiore sono presenti scanalature in cui sono presenti cellule epidermiche igroscopiche (*Giardini et al., 2000*).

Le foglie formano un angolo con il fusto che è un carattere tipicamente varietale, così come altri caratteri quali la lunghezza, la larghezza e la forma delle foglie. La foglia terminale presenta una conformazione “a bandiera”, ed è di dimensioni inferiori alle altre e la sua guaina, nella fase di botticella, avvolge la spiga, determinando il tipico ingrossamento. L'infiorescenza è una spiga compatta caratterizzata da un breve rachide, con un numero variabile di nodi, da 10 a 30, e ad ogni nodo sono inserite tre spighe uniflore.



Fig. N°5: *Hordeum vulgare*.

Tali spighette sono formate da glume sterili, ridotte a semplici formazioni pelose, che racchiudono al loro interno i fiori protetti da piccole brattee fertili: lemma (glumetta inferiore) e palea (glumetta superiore). La lemma avvolge la palea ed entrambe alla maturazione aderiscono alle cariossidi (frutto vestito), ad eccezione delle varietà dette a cariossidi nuda. I tre fiori risultano fertili nelle forme polistiche, mentre negli orzi distici lo è solamente quello centrale e in questo caso la spiga matura presenta solo due ranghi di cariossidi. Mentre nel frumento la spiga è generalmente eretta, nell'orzo spesso la spiga è reclinata per l'arcuamento dell'ultimo internodo o della spiga stessa.

Il frutto è una cariosside di colore giallognolo, talvolta biancastro, rossastro, o nero in alcuni casi. L'embrione è strettamente saldato al pericarpo, il solco

ventrale è più o meno marcato e l'appendice apicale, la rachilla, si presenta più o meno pelosa.

La cariosside presenta una lunghezza che può variare dagli 8 ai 12 mm, una larghezza di 3-4 mm ed uno spessore attorno ai 2-3 mm.

Il peso delle cariossidi vestite varia tra i 27 e i 56 g, e gli invogli seminali costituiscono, in media, dal 10 al 15% del peso del frutto (*Giardini et al., 2000*).

L'orzo presenta un apparato radicale di tipo fascicolato che, in terreni profondi, può raggiungere anche due metri.

Al momento della germinazione si sviluppano le radici seminali o primarie, a cui segue l'emissione del coleoptile, che avvolge l'epicotile (la prima foglia vera) sino al momento dell'emergenza.

Il sistema radicale secondario (radici avventizie che si sviluppano dalla base della corona) si accresce in un secondo momento, a partire dalla fase di accestimento; la pianta può completare il suo ciclo anche senza lo sviluppo delle radici avventizie o secondarie, e quindi raggiunge la maturità con le sole radici seminali.

Il ciclo vegetativo è simile a quello del frumento e presenta quindi le tipiche fenofasi dei cereali autunno-vernini: germinazione, accestimento, levata, botticella, fioritura e maturazione.

La fioritura, che avviene verso la fine di aprile, inizia dalle spighe centrali e spesso si avvia quando ancora la pianta si trova in fase di botticella e gli stami, talvolta, non sono ancora fuoriusciti. Dal momento dell'antesi si sviluppano le cariossidi, che rappresentano l'ultimo organo che cessa di accrescersi nella pianta, e il periodo tra la fioritura e la fine del riempimento delle cariossidi varia dai 20 ai 40 giorni.

Il ciclo di sviluppo dell'orzo è più breve di quello del frumento e ciò gli consente di raggiungere la maturazione prima delle alte temperature estive (Giardini *et al.*, 2000).

1.21. Caratteristiche *Hordeum vulgare* varietà Nure

Nure è una varietà di orzo distico invernale ottenuta dall'incrocio delle varietà (FIOR 40 x ALPHA2) x BARAKA. È a ciclo precoce a taglia media, con una buona tolleranza all'allettamento e una produttività della pianta medio-elevata. È coltivabile in tutti gli ambienti italiani di coltivazione, particolarmente al centro sud dell'Italia si dimostra sempre una delle varietà mistiche più produttive. Ha un buon equilibrio tra capacità di accestimento, fertilità della spiga e peso della cariosside. Poco suscettibile agli attacchi di iodio e alle altre fitopatie tipiche della specie.

Scheda tecnica:

Portamento della pianta:	Prostato
Altezza a maturità:	92 cm
Colore della pianta:	Glaucescenze
Epoca di semina:	Autunnale
Forma della spiga:	Distica a 2 ranghi
Colore della spiga:	Glaucescenza lieve e lunghe reste
Epoca di spigatura:	Medio tardiva
Resistenza alle malattie:	Buona
Resistenza all'allettamento:	Buona
Peso 1000 semi:	49 grammi
Ambiente di coltivazione:	Buona adattabilità a tutti gli areali italiani di coltivazione

2. SCOPO DELLA TESI

Questo studio ha avuto lo scopo di valutare con un approccio fisiologico, biochimico ed ecologico, la tossicità del cadmio a concentrazioni crescenti di 10^{-6} M, 10^{-5} M e 10^{-4} M su un cereale largamente coltivato, l'orzo (*Hordeum vulgare*).

In particolare, sono state analizzate le varie risposte dovute all'esposizione da cadmio a livello della crescita e dello sviluppo della pianta valutando i parametri allometrici, l'inibizione di crescita, la presenza di danni ultrastrutturali, il contenuto di acqua e dei pigmenti fotosintetici, la determinazione dei principali indici fotochimici, la valutazione dei livelli delle heat shock protein 70 (HSP70), la valutazione dei livelli della proteina D1 del PSII, e della Rubisco, l'accumulo di amido, la determinazione dell'attività enzimatica della G6PDH e della nitrato reductasi e la variazione del profilo degli amminoacidi liberi.

I risultati hanno permesso di determinare il grado di stress esercitato dal cadmio sulla morfologia e la fisiologia della pianta; gli effetti sull'espressione e sull'attività di alcuni dei principali enzimi coinvolti nel metabolismo basale sono stati analizzati per determinare i possibili meccanismi di risposta di questo cereale all'accumulo di metalli pesanti.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Coltivazione delle piantine d'orzo

I semi di orzo (*Hordeum vulgare*, var. Nure) forniti dall'Istituto Sperimentale di Cerealicoltura di Fiorenzuola d'Arda (PC) erano posti a germinare al buio su carta da filtro Whatman umida in camera termostata a 21°C per sette giorni.

Dopo tale periodo le piantine sono state poste per una settimana in idrocoltura, esposte ad un fotoperiodo luce/buio 16h/8h ($150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

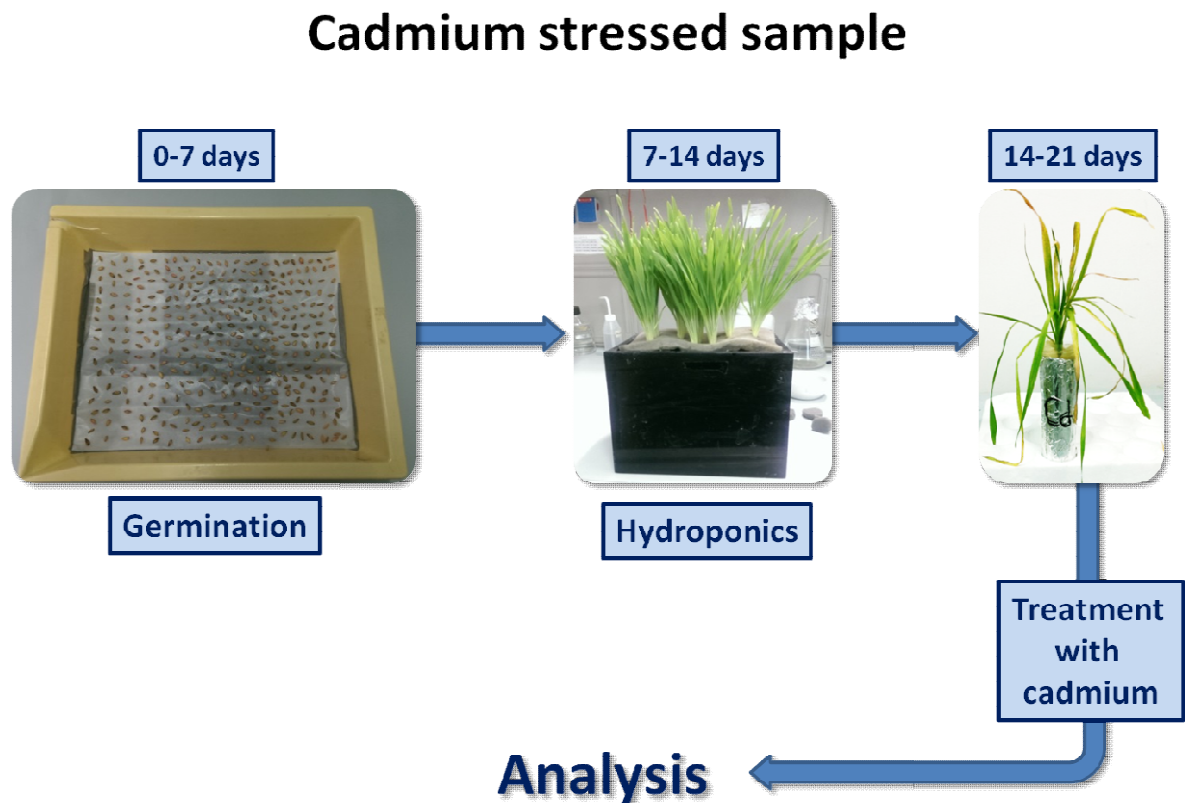


Fig. N°6: Schema di coltivazione delle piantine d'orzo.

Il terreno di coltura a pH 6.5 aveva la seguente composizione:

KH₂PO₄	40 mM
K₂HPO₄	40 mM
K₂SO₄	5 mM
MgCl₂	4 mM
Oligo-elementi	
FeSO₄ EDTA	15,25 mg/L
Cacl₂	1 mM
(NH₄)₂SO₄	2,5 mM
H₂O	Volume finale 1L

Erano aggiunti gli oligoelementi alle seguenti concentrazioni:

Oligoelementi	
KCl	1,9 mg/l
H₃BO₃	0,8 mg/l
CuSO₄ x 5 H₂O	0,06 mg/l
MnSO₄	0,43 mg/l
ZnSO₄ x 7 H₂O	0,3 mg/l
(NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4H₂O	0,01 mg/l

Gruppi di 50 piantine di orzo, provenienti dall'idrocoltura, erano poste per una settimana in idrocoltura su terreno di coltura liquido in presenza di cadmio (sotto forma di CdCl_2) alle concentrazioni 10^{-6} M, 10^{-5} M e 10^{-4} M. Le piantine di orzo erano cresciute con un fotoperiodo luce/buio 16 h/8 h ($150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$); inoltre, il terreno liquido veniva continuamente areato con aria.

Dopo sette giorni di esposizione al cadmio, le piantine venivano prelevate per le analisi:

- ✓ Estrazione e valutazione dei livelli delle HSP70;
- ✓ Analisi fenotipiche della componente epigea delle piantine d'orzo;
- ✓ Determinazione dell'inibizione di crescita, del contenuto d'acqua e dei pigmenti fotosintetici;
- ✓ Determinazione dei principali indici fotochimici;
- ✓ Estrazione e valutazione dei livelli della D1 e della Rubisco;
- ✓ Estrazione e determinazione dei livelli di amido;
- ✓ Analisi al microscopio elettronico a scansione/trasmissione (SEM e TEM);
- ✓ Estrazione e determinazione dei livelli e d'attività enzimatica della G6PDH;
- ✓ Estrazione e determinazione del contenuto di amminoacidi liberi mediante HPLC;
- ✓ Analisi fenotipiche della componente ipogea delle piantine d'orzo;
- ✓ Determinazione dell'attività della nitrato reductasi.

3.2. Analisi fenotipiche delle piantine d'orzo

Per ogni condizione, venivano prelevate 5 piante, che erano sottoposte alle misure biometriche. Sono state rilevate il numero, la lunghezza e la larghezza delle foglie di ciascuna pianta, mentre sono state rilevate per ogni pianta il numero e la lunghezza delle radici. Le misurazioni biometriche sono state ottenute utilizzando il software IMAGEJ (<http://imagej.net>).

Le piantine erano disposte su fogli di carta, fotografate ed elaborate dal Software; inoltre, l'analisi biometrica ha previsto l'acquisizione delle immagini delle piantine, di cui sono state selezionate le più significative al fine di illustrare gli effetti macroscopici del cadmio.

3.3. Determinazione della capacità fotosintetica e dello stato fisiologico

Al fine di ottenere informazioni sulla capacità fotosintetica e sullo stato fisiologico delle piantine di orzo controllo e stressate da cadmio sono stati determinati alcuni indici fotochimici con la tecnica dell'emissione di fluorescenza da parte della clorofilla *a* del fotosistema II (PSII). Si tratta di una metodologia d'indagine non invasiva e non distruttiva per l'organismo vegetale che permette di valutare l'efficienza di conversione della luce ai centri di reazione, fornendo un'indicazione sulla funzionalità dell'apparato fotosintetico nelle reazioni della fase luminosa della fotosintesi (*Schreiber et al. 1994*). Il principio su cui si basa l'analisi fluorimetrica prevede che l'energia luminosa

assorbita dalle molecole di clorofilla in una foglia possa andare incontro a tre destini:

- Essere utilizzata per le reazioni fotochimiche della fotosintesi (dissipazione fotochimica);
- Essere dissipata come calore se in eccesso (dissipazione termica);
- Essere riemessa come fluorescenza;

Questi tre processi sono in competizione tra loro, e dato che la loro somma rappresenta la percentuale totale dell'energia assorbita, l'incremento di uno di essi, determinerà il decremento degli altri due. Pertanto misurando la resa della fluorescenza, è possibile ottenere informazioni relative alla variazione di efficienza fotochimica ed alla dissipazione termica. Le misure di fluorescenza sono state effettuate tramite un fluorimetro portatile FluorPEN (Photon System Instrument, Czech Republic).

Prima di procedere all'analisi fluorimetrica le piante erano acclimatate al buio per 30 minuti. Quando una foglia adattata al buio viene illuminata, si instaura una cinetica particolare chiamata "Effetto Kautsky". Il primo evento che si osserva è un rapido incremento della fluorescenza dal valore di base (F_0) ad un valore massimo (F_m), seguito da una lenta diminuzione fino al raggiungimento di un livello stazionario di fluorescenza (F'). L'emissione di fluorescenza è osservata quando i centri di reazione del Fotosistema II sono "chiusi", cioè

accade quando il plastochinone QA, avendo accettato un elettrone non può accettarne altri e si trova in uno stato ridotto (*Maxwell e Johnson, 2000*); proseguendo con l'illuminazione, nel giro di pochi minuti il livello di fluorescenza diminuisce progressivamente (*Schreiber et al. 1994*).

Tale fenomeno è chiamato “quenching” o smorzamento della fluorescenza e può essere ricondotto a due cause. Una parte dell'energia assorbita dalla foglia può essere dissipata fotochimicamente dando origine ad un “quenching fotochimico della fluorescenza” (qP), un'altra parte può essere dissipata sotto forma di calore, questo secondo processo è chiamato “quenching non-fotochimico” (qN o NPQ)(Fig. N°7).

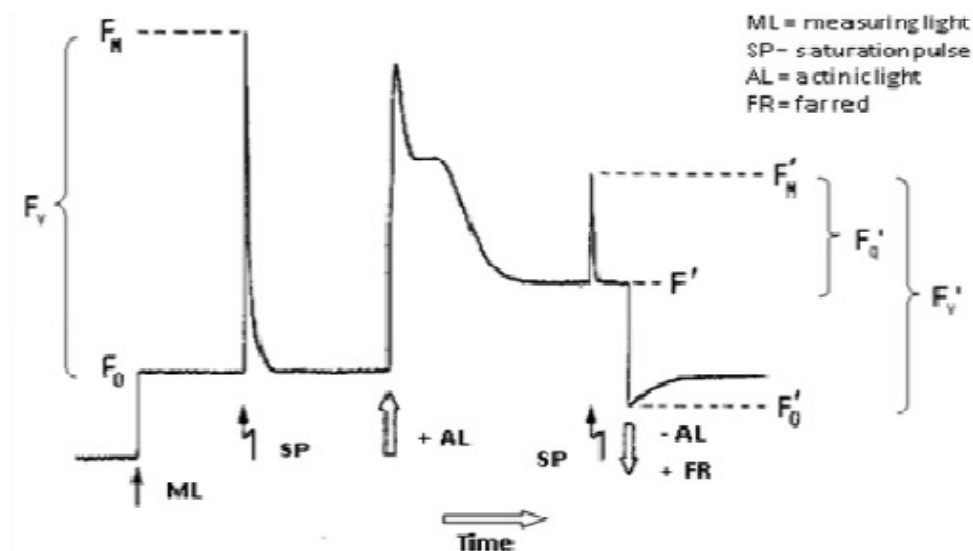


Fig. N°7: Metodo del saturation pulse.

Gli indici di fluorescenza utilizzati in questo studio sono stati:

- **QY** (resa quantica del trasporto elettronico del fotosistema II) definisce la proporzione di quanti di luce assorbita utilizzata nei processi fotochimici.

$$QY = (F_m' - F')/F_m' \text{ (Genty et al., 1989)}$$

- **Fv/Fm** (massima resa quantica del PSII) stima la massima efficienza del fotosistema II in foglie adattate al buio.

$$Fv/Fm = (F_m - F_0)/F_m \text{ (Kitajima e Butler 1975)}$$

- **ETR** (Attività di trasporto elettronico attraverso il PSII), stima il flusso elettronico che passa attraverso la catena di trasporto per mole di fotone assorbita.

$$ETR * PPFD * 0.5 * 0.84 \text{ (Maxwell e Johnson 2000)}$$

Dove PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) è la densità di flusso fotonico, 0.84 rappresenta la percentuale media di luce incidente realmente assorbita dalla foglia e 0.5 il fattore che tiene conto dell'uguale ripartizione dell'energia tra i 2 fotosistemi;

- **NPQ** (quenching non-fotochimico o dall'inglese **Non Photochemical Quenching**), esprime l'estinzione della fluorescenza dovuta a processi non fotochimici, in particolare la dissipazione di energia sotto forma di calore. Questo indice dimostra come può essere regolato il livello di eccitazione energetica dei complessi antenna, prevenendo così un eccesso di potere riducente a livello della catena di trasporto degli elettroni e dunque la

fotoinibizione. La formula per il calcolo del quenching non fotochimico è la seguente:

$$\text{NPQ} = (\text{Fm} - \text{Fm}') / \text{Fm} \text{ (Bilger e Björkman 1990)}$$

Nel disegno sperimentale utilizzato in questo studio, le analisi fotochimiche sono state eseguite sulla foglia apicale.

3.4. Estrazione delle proteine Rubisco, D1, G6PDH e HSP70

I campioni di foglie erano polverizzate con azoto liquido con l'ausilio di mortaio e pestello; 300 mg di campione polverizzato erano successivamente omogeneizzati con il tampone di estrazione, in un rapporto di 1:2 tra peso fresco del campione e volume di tampone d'estrazione, mediante l'utilizzo di un omogeneizzatore automatico TissueLyser con due sfere di acciaio per ciascun campione (Stainless Steel Beads; ø 5 mm).

L'omogenato era centrifugato a 4°C per 10 min a 13000 RPM in una centrifuga Thermo Scientific SL16R; dopo la centrifugazione il surnatante contenente le proteine solubili veniva ricentrifugato per 10 min. Il surnatante nuovamente recuperato era utilizzato per le determinazioni successive.

Tamponi di estrazione:

Proteina	Composizione tampone di estrazione
Rubisco e D1	<ul style="list-style-type: none">• 100 mM Tris-HCl, pH 8.0;• 5 mM MgCl₂ ;• 1% β-mercaptoetanolo (v/v);• 2mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride);• 30 mg di polivinilpirrolidone);
HSP70	<ul style="list-style-type: none">• 32 mM Tris HCL, pH 8.0;• 10 mM EDTA;• 1 mM β-mercaptoetanolo;• 0.5% Triton X-100;• 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride);
G6PDH	<ul style="list-style-type: none">• 50 mM Tris-HCl, pH 8.5• 5 mM MgCL₂• 4 mM EDTA• 10% glicerolo

3.5. Saggio di Bradford

La concentrazione delle proteine era determinata mediante il saggio del Blue-Coomassie R-250 (Bradford, 1976) utilizzando una retta di taratura ottenuta a concentrazioni note di BSA (albumina di siero bovina).

Aliquote di estratto (2-4 μ l) erano saggate mediante il reattivo di Bradford Protein Assay (Bio-Rad) secondo le istruzioni fornite dal fabbricante e l'assorbanza a 595 nm registrata allo spettrofotometro (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis).

3.6. Elettroforesi in condizioni denaturanti

L'elettroforesi SDS PAGE è una tecnica che permette la separazione delle proteine in relazione al loro peso molecolare, mediante l'uso di un particolare tipo di gel di poliacrilammide.

I gel venivano polimerizzati in supporti verticali che permettono di ottenere gel di dimensioni 8,5 cm x 6,5 cm con spessore di 1 mm.

Il gel è costituito da due parti: una parte superiore ed una inferiore. La parte superiore è definita stacking gel, è caratterizzata da una percentuale di acrilamide pari al 4% (p/v) e da un pH di 6.8. La parte inferiore è definita “*running*” o “*resolving*” ed è caratterizzata da un valore di pH pari a 8.8 ed una concentrazione di acrilamide pari al 10% (p/v).

- **Running gel.** È una soluzione di poliacrilammide al 10% che è stata utilizzata per la realizzazione della porzione di gel deputata alla separazione delle proteine in base al loro peso molecolare.

Per polimerizzare 5 mL di *running* sono stati aggiunti 5 µl di TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiammina) e 50 µl di ammonio persolfato 10 mg/mL (APS, iniziatore radicalico). La polimerizzazione del gel procede attraverso una reazione a catena del tipo testa-coda. Il TEMED innesca la reazione in presenza di APS che si decompone rilasciando radicali liberi, e avviando il processo per la formazione di legami crociati che determinano le dimensioni dei pori del gel. Tale polimerizzazione è un esempio di catalisi radicalica, in cui i radicali liberi a causa della presenza di un elettrone spaiato, devono appaiarsi con un altro elettrone per stabilizzare la molecola, reagendo quindi con un monomero di acrilamide.

- **Stacking gel.** È una soluzione caratterizzata da una più bassa percentuale di acrilamide (4%) rispetto al running gel, ciò determina la formazione di maglie più larghe che servono ad allineare i polipeptidi e le proteine su una stessa linea di partenza. Per facilitare la corsa vengono formati dei “pozzetti” per caricare i campioni e allinearli nelle diverse corsie (lane) di corsa elettroforetica.

Per far polimerizzare lo stacking (2.5 mL) sono stati aggiunti 5 µl di TEMED e 18,5 µl di APS 10 mg/mL.

Running gel 10%	
H₂O	4,010 ml
Tris-HCl 1,5mM, pH 8.8	2,500 ml
Acrilamide 30%	3,340 ml
SDS 10%	100 µl
APS 10%	50 µl
TEMED	5 µl

Stacking gel 4%	
H₂O	2,258 ml
Tris-HCl 0,5mM pH 6.8	945 µl
Acrilamide 30%	501 µl
SDS 10%	37,5 µl
APS 10%	18,5 µl
TEMED	5 µl

Tampone di corsa 1X	
TRIS	6,056 gr
GLICINA	28,82 gr
SDS	2 gr
H₂O	qb 1 L

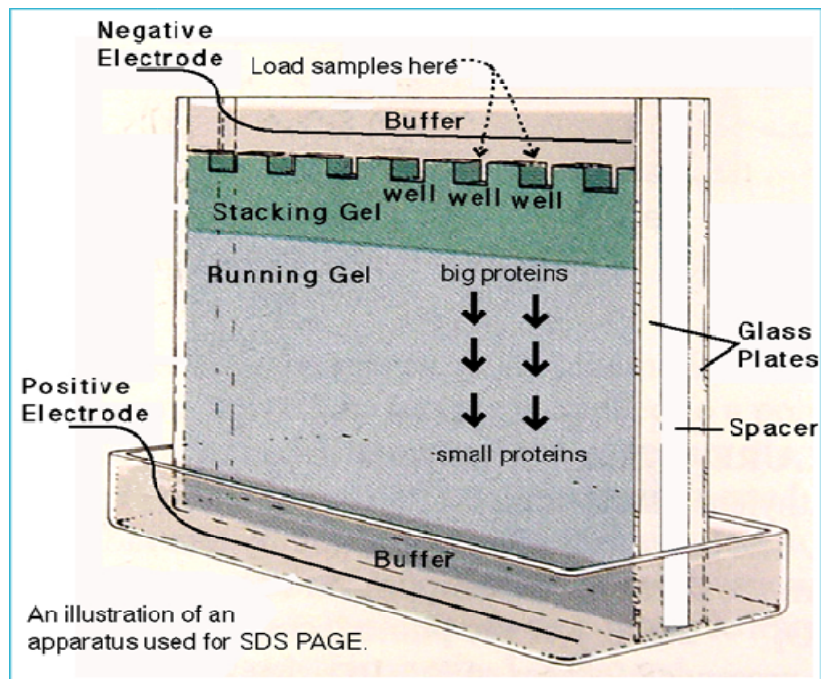


Fig. N°8: Illustrazione schematica di un supporto per SDS PAGE.

Prima di essere caricate le proteine erano denaturate al calore in presenza di SDS e β -mercaptoetanolo (100°C per 10 min).

Per verificare l'esatto peso molecolare delle proteine, un pozzetto veniva caricato con una soluzione di marker a pesi molecolari noti (2-5 μ l).

Gli estratti, in seguito, erano caricati tutti alla medesima concentrazione di proteine (14 μ g/ μ l) nel gel di poliacrilammide al 10% in condizioni denaturanti e sottoposti a un campo elettrico di 180 V e 40 mA 10 W per circa 40 minuti in una cella per elettroforesi BIO-RAD Mini-Protean Tetra System, riempita con un opportuno tampone di corsa.

Al termine della corsa elettroforetica, i gel ottenuti sono stati utilizzati per l'individuazione delle HSP70, G6PDH, D1 e Rubisco, mediante la tecnica del western blotting.

3.7. Western Blotting

Con la tecnica del western blotting è possibile trasferire le proteine, separate durante l'elettroforesi, dal gel ad una membrana di nitrocellulosa al fine di poter identificare la proteina di interesse grazie alla reazione con un anticorpo specifico (Fig. N°9). Il trasferimento delle proteine sul supporto di nitrocellulosa avviene applicando una corrente elettrica in un ambiente a pH basico (comunemente pH 8.5).

Il western blotting consta di 4 fasi sequenziali:

- Allestimento Sandwich;
- Trasferimento;
- Sviluppo;
- Rivelazione;



Fig. N°9: Supporto Western blotting.

Per il trasferimento si va a costruire la cosiddetta struttura a sandwich (Fig. N°10), utilizzando un apposito supporto. Partendo dal lato nero del supporto, quindi dal basso verso l'alto, si avrà questa stratificazione:

- Spugna;
- Carta assorbente;
- Gel SDS PAGE;
- Membrana di nitrocellulosa;
- Carta assorbente;
- Spugna;

Una volta chiuso a sandwich, il supporto viene posto in un'apposita cella (BIO-RAD Mini-Protean Tetra System), ricoperto di tampone di trasferimento e sottoposto ad un campo elettrico di 9V/25V, 300 mA a 4°C (2 ore oppure overnight).

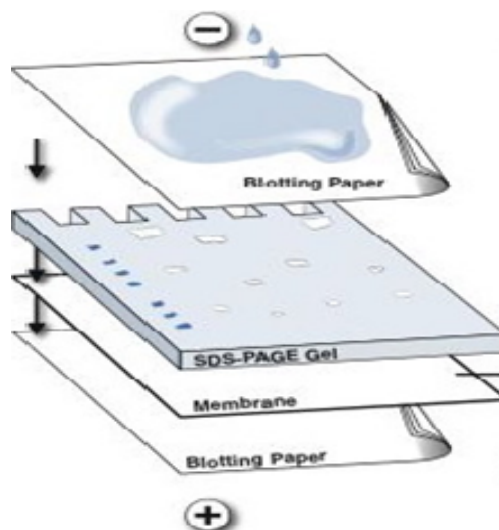


Fig. N°10: Allestimento sandwich.

Al termine della procedura si controlla l'avvenuto trasferimento osservando il corretto posizionamento dei markers colorati sulla membrana di nitrocellulosa, e colorando il filtro con rosso Ponceau, così da visualizzare le proteine trasferite sulla membrana stessa. Il filtro veniva quindi rapidamente decolorato sotto acqua corrente e incubato con gli anticorpi.

Il filtro veniva incubato con una soluzione di tampone fosfato (TBS) contenente il detergente Tween-20 allo 0.1% (*TBS-Tween*) ed albumina da siero bovino (BSA) all' 1% per 1 ora a temperatura ambiente, al fine di saturare i siti di legame aspecifici. In seguito, il filtro era incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo primario (anti-HSP70, anti-G6PDH, anti-D1 oppure Anti-Rblc) diluito in *TBS-Tween* contenente BSA all'1%. Dopo 3 lavaggi per 10 minuti con *TBS-Tween*, il filtro era incubato con l'anticorpo secondario anti-rabbit IgG (peroxidase conjugate-Sigma) diluito 1:16000 in *TBS-Tween*.

L'anticorpo secondario riconosce specificamente l'anticorpo primario ed è generalmente coniugato con composti che ne permettono l'evidenza (di solito la perossidasi di rafano HRP). La perossidasi di rafano in presenza di perossido d'idrogeno ossida il suo substrato, il luminolo, con concomitante emissione di luce. Al termine dell'incubazione con l'anticorpo secondario vengono effettuati lavaggi in *TBS-Tween* (3 x 10 minuti).

La rivelazione della presenza delle proteine avveniva mediante chemiluminescenza, (ECL). Perossido d'idrogeno e luminolo sono contenuti nel kit ECL (Western Bright™ Quantum, ADVANSTA) che dopo esser stato

emulsionato viene pipettato sulla membrana. Quest'ultima è poi posta in un rilevatore fornito di telecamera e software ChemiDoc (BIO-RAD XRS).

3.8. Percentuale d'inibizione di crescita

La percentuale d'inibizione di crescita, parametro utilizzato in biologia vegetale, indica la differenza di biomassa di un campione vegetale studiato rispetto a un campione vegetale di controllo, espressa in percentuale.

Per determinare la percentuale d'inibizione di crescita tra piantine di orzo stressate alle diverse concentrazioni di cadmio rispetto alle piantine di controllo, al termine del periodo di esposizione al metallo pesante, venivano pesate 20 piantine per condizione, mediante una bilancia analitica, e veniva riportato il peso fresco dei campioni stressati con cadmio (MT) e dei campioni controllo (MC). Ottenuti i vari dati, si procedeva con gli opportuni calcoli utilizzando la seguente formula:

$$\% \text{ GI} = (1 - \text{MC} / \text{MT}) * 100$$

3.9. Water content

Il water content (WC) indica la quantità di acqua presente in un campione rispetto al suo peso secco, ed è espresso come rapporto gr. H₂O/ gr. DW.

Per determinare la quantità di acqua nei campioni vegetali studiati, gruppi di tre piantine di orzo controllo e stressate alle diverse concentrazioni di cadmio venivano pesate, mediante una bilancia analitica, e veniva riportato il peso

fresco (FW) di ciascuna piantina. In seguito, le piantine erano essiccate mediante una stufa termostata per 48 ore a 75°C.

A questo punto, le piantine essiccate venivano pesate, mediante una bilancia analitica, e veniva riportato il peso secco (DW) di ciascuna piantina. Ottenuti i vari dati, si procedeva agli opportuni calcoli utilizzando la seguente formula:

$$WC = FW - DW / DW$$

3.10. Determinazione del contenuto dei pigmenti fogliari

La concentrazione di clorofilla a, clorofilla b e di carotenoidi è stata determinata attraverso via spettrofotometrica, adattando il protocollo di *Zhang e Kirkham (1996)*.

L'analisi ha riguardato i campioni costituiti dai coleottili delle piantine di orzo stressate e di controllo. I campioni, di cui è noto il peso, sono stati immersi in 10 ml di soluzione di acetone all'80%, al fine di solubilizzare i pigmenti contenuti nelle piantine.

Successivamente i campioni sono stati mantenuti al buio e alla temperatura di 4°C per un periodo di una settimana.

Al termine del periodo d'incubazione si è proceduto alla lettura spettrofotometrica del surnatante, utilizzando le lunghezze d'onda specifiche per ciascuna tipologia di pigmento.

In particolare, le lunghezze d'onda utilizzate sono di 663.2, 648.8 e 470.0 nm, valori corrispondenti ai picchi di assorbimento rispettivamente della clorofilla a

(chl a), della clorofilla b (chl b) e dei carotenoidi (car); il bianco è costituito dal solvente puro.

I valori di assorbanza (A_λ), ottenuti dalla lettura spettrofotometrica, permettono quindi di ricavare le concentrazioni dei tre pigmenti, in termini di $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ di surnatante, attraverso il calcolo delle seguenti relazioni matematiche:

$$[\text{chl a}] \mu\text{g ml}^{-1} = (12.25 \cdot A_{663.2}) - (2.79 \cdot A_{648.8})$$

$$[\text{chl b}] \mu\text{g ml}^{-1} = (21.50 \cdot A_{648.8}) - (5.10 \cdot A_{663.2})$$

$$[\text{car}] \mu\text{g ml}^{-1} = [(1000 \cdot A_{470.0}) - (1.82 [\text{chl a}] + 85.02 [\text{chl b}])] / 198$$

Al fine di trovare le concentrazioni dei pigmenti relativamente all'unità di peso fresco (PF) del materiale vegetale, i valori ottenuti vengono quindi rapportati al peso di ciascun campione e al volume totale di surnatante (V_{surn}) secondo la seguente relazione:

$$[\text{pigmento}] \mu\text{g g}^{-1} = (V_{\text{surn}} / \text{PF}) \cdot [\text{pigmento}] \mu\text{g ml}^{-1}$$

3.11. Analisi del contenuto di amido

Il materiale vegetale è stato polverizzato finemente con azoto liquido con l'ausilio di mortaio e pestello. Ogni campione omogenato è stato quindi risospeso in 40 ml di KOH 10 mM. La sospensione così ottenuta è portata ad ebollizione per un minuto, al fine di solubilizzare l'amido contenuto nei campioni. Al termine di questa operazione sono stati aggiunti, ad ogni singolo campione, 400 μl di HCl 1 N al fine di neutralizzare completamente la

soluzione. Prima di procedere alla lettura spettrofotometrica occorre preparare una serie di standard per la misura. A questo scopo è stata quindi preparata una soluzione costituita da 50 mg di amido solubile (proveniente da patata, Sigma Aldrich) diluito in 50 ml di H₂O, solubilizzato previa bollitura per un minuto. Gli standard erano preparati come di seguito: 0, 20, 40, 60, 80 e 100 µl della soluzione di amido precedentemente preparata, portati a volume di 100 µl con H₂O. Agli standard erano quindi aggiunti 50 µl di soluzione “neutralizzata”, costituita da 100 ml di KOH 10 mM più 1 ml di HCl 1 N. Per i campioni si utilizzavano 50 µl di estratto e a questo si aggiungevano 100 µl di H₂O. Come ultimo passaggio era aggiunta agli standard e ai campioni 1 ml di soluzione di iodio, ottenuta diluendo la soluzione madre (I₂ 1,3 % - KI 3 %) 1: 10 con H₂O . Il materiale, dopo 10 minuti, era pronto per la lettura allo spettrofotometro, alla lunghezza d’onda di 595 nm, assorbanza specifica per lo iodio. Il volume degli standard utilizzati corrisponde alla loro quantità espressa in µg. Quindi, dopo le opportune elaborazioni matematiche, è stato possibile ricavare la quantità di amido presente nei singoli campioni.

Attraverso la curva di riferimento elaborata con i valori di assorbanza degli standard alla lunghezza d’onda di 595 nm (Fig. N°11), è stato possibile estrapolare il contenuto di amido dei campioni sui 50 µl di estratto utilizzati.

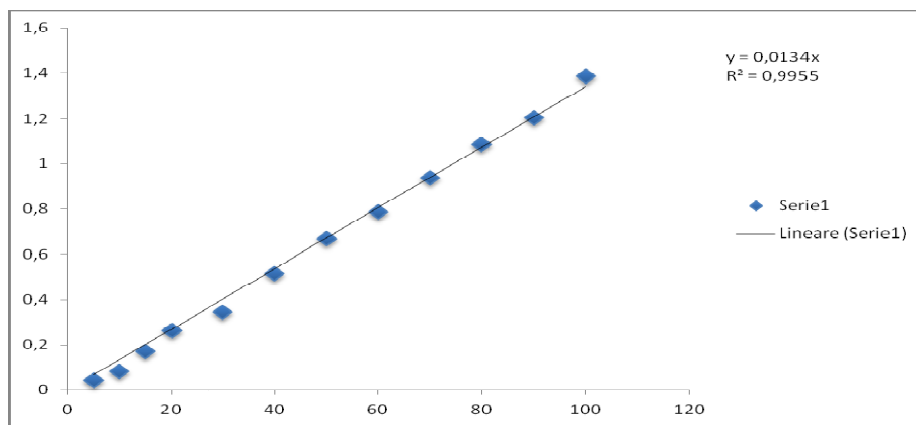


Fig. N°11: Curva di riferimento dell'amido.

Il valore ottenuto è stato successivamente rapportato ai 50 ml di soluzione estratta inizialmente, e quindi al peso del singolo campione.

3.12. Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Le piante sono state accuratamente lavate in acqua distillata per 15 minuti con numerosi cambi di acqua per eliminare il cadmio non legato. I tessuti erano fissati in glutaraldeide al 2% in tampone fosfato (0.065 M, pH 7.2-7.4) per 1.5 ore a temperatura ambiente. I campioni erano disidratati con etanolo, essiccati e montati su stubs di carbonio, ricoperti da una pellicola di carbonio di spessore 15 nm e osservati con un microscopio elettronico a scansione (SEM) mod. Cambridge 250 Mark 3.

3.13. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Le osservazioni al microscopio elettronico sono state eseguite su campioni esposti in vitro per uno, tre e sette giorni a concentrazione di $\text{Cd}^{++} 10^{-4}$ M. Per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM), i campioni sono stati fissati in

glutaraldeide al 3% in tampone fosfato (pH 7.2-7.4) per 1,5 ore a temperatura ambiente e post-fissati con buffer tetrossido di osmio (OsO_4) all'1% per 1.5 ore a temperatura ambiente, disidratati con etanolo e ossido di propilene e incorporati in resina epossidica (Spurr), (*Basile et al. 2011*). Sezioni ultra-sottili (80 nm di spessore) sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo, poi montate su griglie di rame e osservati con un Philips EM 208S TEM (*Basile et al. 2011*).

3.14. Saggio enzimatico G6PDH

Il saggio era effettuato a 25° C in cuvette da 1 cm di cammino ottico (UV grade), monitorando le variazioni di assorbanza utilizzando uno spettrofotometro Cary 60. Il saggio di attività della G6PDH (EC 1.1.1.49; G6PDH) (*Esposito et al. 1998*) era realizzato aggiungendo l'estratto ad una miscela di reazione avente la seguente composizione (volume finale 1 ml): 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl_2 , 0.15 mM NADP^+ , 3 mM G6P e l'estratto. L'attività enzimatica era misurata come quantità di enzima in grado di ridurre 1 nmole di NADP^+ al minuto. L'attività specifica veniva espressa per mg di proteina presente nell'estratto.

3.15. Estrazione e misura dell'attività della nitrato reductasi

Tutte le operazioni venivano eseguite a freddo (0-6°C). I campioni di foglie e radici delle piantine d'orzo venivano tagliate in pezzi piccoli, riposti in un mortaio e polverizzati con azoto liquido con l'ausilio di un pestello; 1 gr. di

polverizzato era successivamente omogeneizzato con il tampone di estrazione (25 mM tampone fosfato, pH 7.2; 1 mM cisterna; 25 μ M FAD;) in un rapporto di 1:2 tra peso fresco del campione e volume di tampone d'estrazione. Gli estratti erano centrifugati a 20000 g a 4°C per 10 minuti in una centrifuga Thermo Scientific SL16R; dopo la centrifugazione il surnatante contenente le proteine solubili veniva ricentrifugato per 10 minuti. Il surnatante nuovamente recuperato era utilizzato per il saggio della nitrato redattasi.

Il saggio di attività della nitrato redattasi era realizzato con la seguente composizione (volume finale 5 ml):

- 1 ml di H₂O ;
- 0,3 ml di Tampone fosfato 0,25 M pH 7.2;
- 0,2 ml di Benzil-Violageno 1 mM;
- 0,2 ml di KNO₃ 0,2 M;
- 0,2 ml di estratto;
- 0,1 ml di soluzione di sodio ditionito (8 mg/ml in tampone fosfato 25mM pH 7.2);

Il saggio veniva incubato per 20 minuti a 30 °C, dopodiché veniva posto in ghiaccio e aggiunto 1 ml di acetato di bario 0,15 M e 1 ml di alcool etilico al 95%. Alla soluzione nascente veniva aggiunto 1 ml di reattivo dei nitriti e si

aspettavano 10 min. In seguito, la miscela ottenuta veniva centrifugata per 5 minuti a 4000 RPM e veniva letta l'assorbanza a 540 nm utilizzando uno spettrofotometro Cary 60.

Ottenuti i dati di assorbanza, si procedeva con gli opportuni calcoli applicando la seguente formula:

$$\text{Attività specifica NR} = \frac{\Delta \text{Abs}_{540} * (100 \text{ UA nMol NO}_2^- * \text{ml}^{-1}) * 0,2 \text{ ml}}{20 \text{ min} * \text{mg prot}}$$

I coefficienti ottenuti venivano espressi secondo l'unità di misura “nmol*min⁻¹*mg⁻¹ prot”.

Il reattivo dei nitriti veniva preparato miscelando una parte di soluzione A (N-1 Naftil-etilene diamino-diidroclorato 80 mg in 100 ml H₂O) con due parti di soluzione B (Sulfonilammide 2 gr. in 200 ml di HCl 25%). I nitriti colorano la soluzione di rosso con un picco a 540 nm.

3.16. Estrazione amminoacidi

Le piante venivano prelevate, le foglie e radici separate e tutto il materiale veniva lavato in H₂O deionizzata e asciugato.

Dopodiché circa 0.2-0.5 gr di tessuto per campione era sottoposto ad analisi. Il campione era dapprima polverizzato in un mortaio con azoto liquido e alla polvere recuperata in eppendorf veniva aggiunto 1 ml di etanolo/acqua 80/20

(v/v). Dopo 15-30 minuti di estrazione a 4° C, i campioni venivano centrifugati per 5 minuti a 14000 RPM, il surnatante poteva essere conservato in freezer a -20° C oppure letto all'HPLC previa filtrazione (C18).

3.17. Analisi degli amminoacidi

Il supernatante veniva utilizzato per la separazione degli amminoacidi mediante HPLC.

L'analisi degli amminoacidi in HPLC avveniva dopo derivatizzazione con *orto*ftaldeide (OPA) (500 µl di 50 mg OPA in 90 mM sodium borate buffer, pH 9.0; 10% metanolo; prima dell'uso veniva aggiunta 1 goccia di β-Mercaptoetanol).

L'apparecchio per HPLC Agilent 1100 Series consisteva di un iniettore a valvola (mod. G1328A), di due pompe (mod. G1310A) e di un rilevatore a lunghezza d'onda variabile (mod. G1314A). Un'aliquota (50 µl) dell'estratto veniva derivatizzata con OPA per 1 minuto; dopodiché un campione di 20 µl di questa miscela veniva iniettato ed eluiva ad una velocità di flusso pari a 1 ml / min. Gli amminoacidi venivano separati in gradiente con una colonna a fase inversa Kinetex[®] 5µm EVO C18 100 Å (250 x 4,6 mm).

Il solvente A era costituito da sodio fosfato dibasico 40 mM (pH 7.8), 1% acido trifluoroacetico, mentre il solvente B era rappresentato da acetonitrile / metanolo / acqua (45:45:10).

Il gradiente applicato era il seguente:

- Min 0: 0 % buffer B;
- Min 40,5: 40,5 % buffer B;
- Min 41: 61 % buffer B;
- Min 43: 61 % buffer B;
- Min 44: 82 % buffer B;
- Min 44,5: 100 % buffer B;
- Min 46,5: 100 % buffer B;
- Min 47: 0 % buffer B;
- Min 49: 0 % buffer B;

I dati ottenuti venivano elaborati e rappresentati in cromatogrammi da un apposito programma (Agilent chemStation Operation cod. G2170). Le concentrazioni amminoacidiche, espresse in $\mu\text{mol/gr.}$ * FW di tessuto, venivano calcolate utilizzando coefficienti di estinzione molare calcolati per i singoli amminoacidi con soluzioni standard.

4. RISULTATI

4.1. Analisi statistica

I dati sperimentali sono stati analizzati statisticamente per poter valutare la significatività delle differenze tra i diversi trattamenti nel tempo. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante ANOVA, seguita dal post-hoc test Student- Newman-Keuls (Sigma-Stat 3.0 package, Jandel Scientific, USA). La differenza è stata valutata significativa per $P < 0.05$. I dati riportati sono medie \pm es. (n=4) per ciascun trattamento.

4.2. Analisi fenotipiche

L'analisi fenotipica della parte aerea delle piantine evidenzia differenze nella morfologia in funzione della concentrazione di cadmio (Fig. N°12).

In particolare è evidente la differenza di crescita, di colore e di turgidità fogliare; all'aumentare della concentrazione di cadmio diminuisce la lunghezza delle foglie (- 42,65%), a favore di un aumento della larghezza (Fig. N°14A e 14B).

Sono state esaminate anche le strutture dell'apparato radicale. In particolare, si evince che in funzione dell'incremento di cadmio vi è una riorganizzazione dell'apparato radicale (Fig. N°13) con una riduzione della lunghezza delle radici primarie (- 48,5%), e un aumento del numero di radici secondarie (Fig. N°14C).

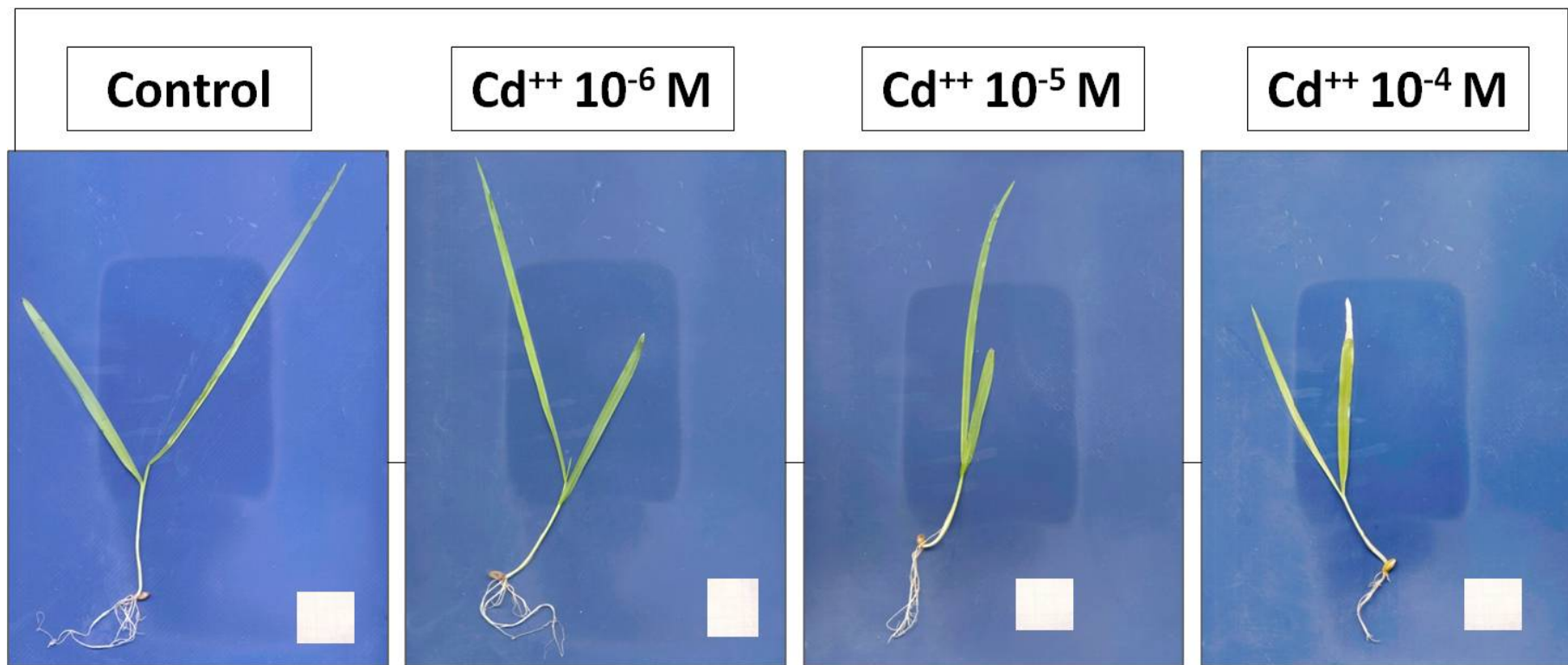


Fig. N°12: Effetti del cadmio su piante di orzo cresciute in idrocoltura in condizioni di controllo (CTRL) ed esposte per 7 giorni a concentrazioni crescenti di cadmio.

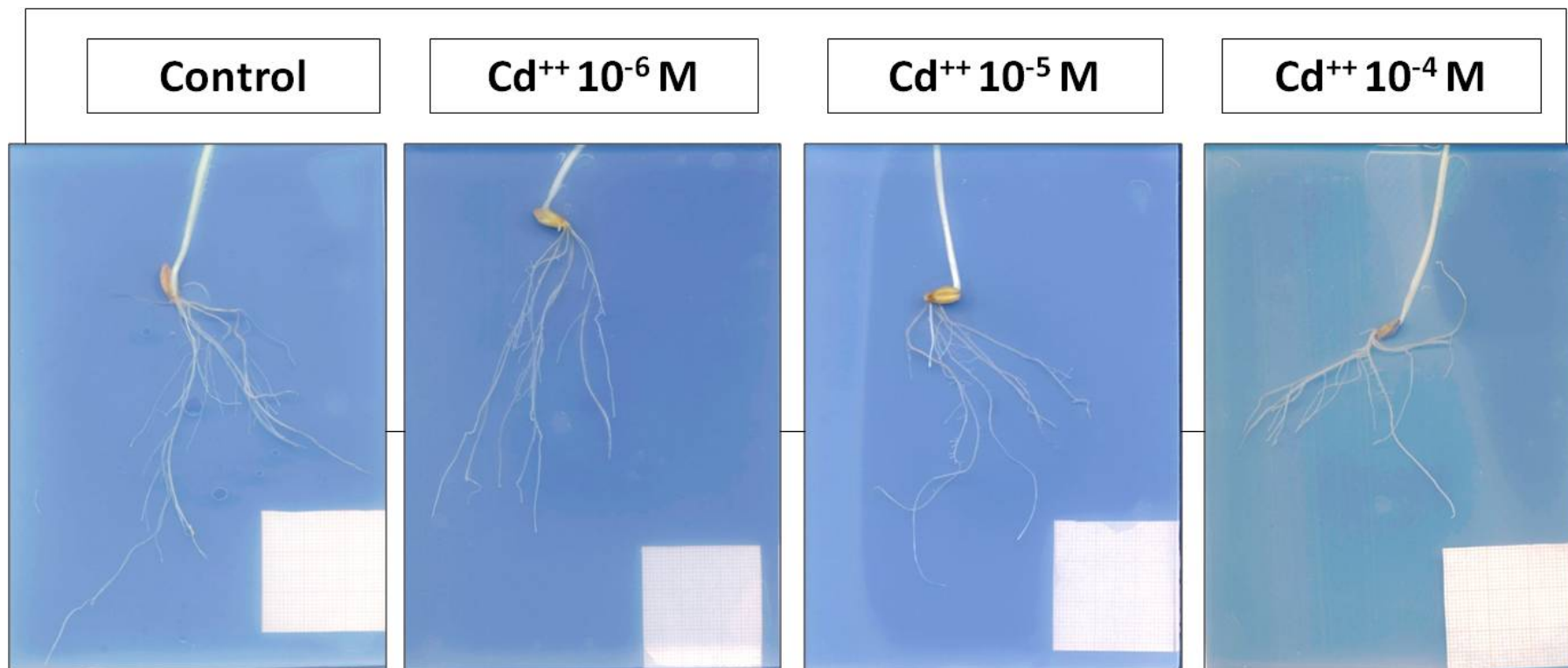


Fig. N°13: Effetti del cadmio sull'apparato radicale di piante di orzo cresciute in idrocoltura in condizioni di controllo (CTRL) ed esposte per 7 giorni a concentrazioni crescenti di cadmio.

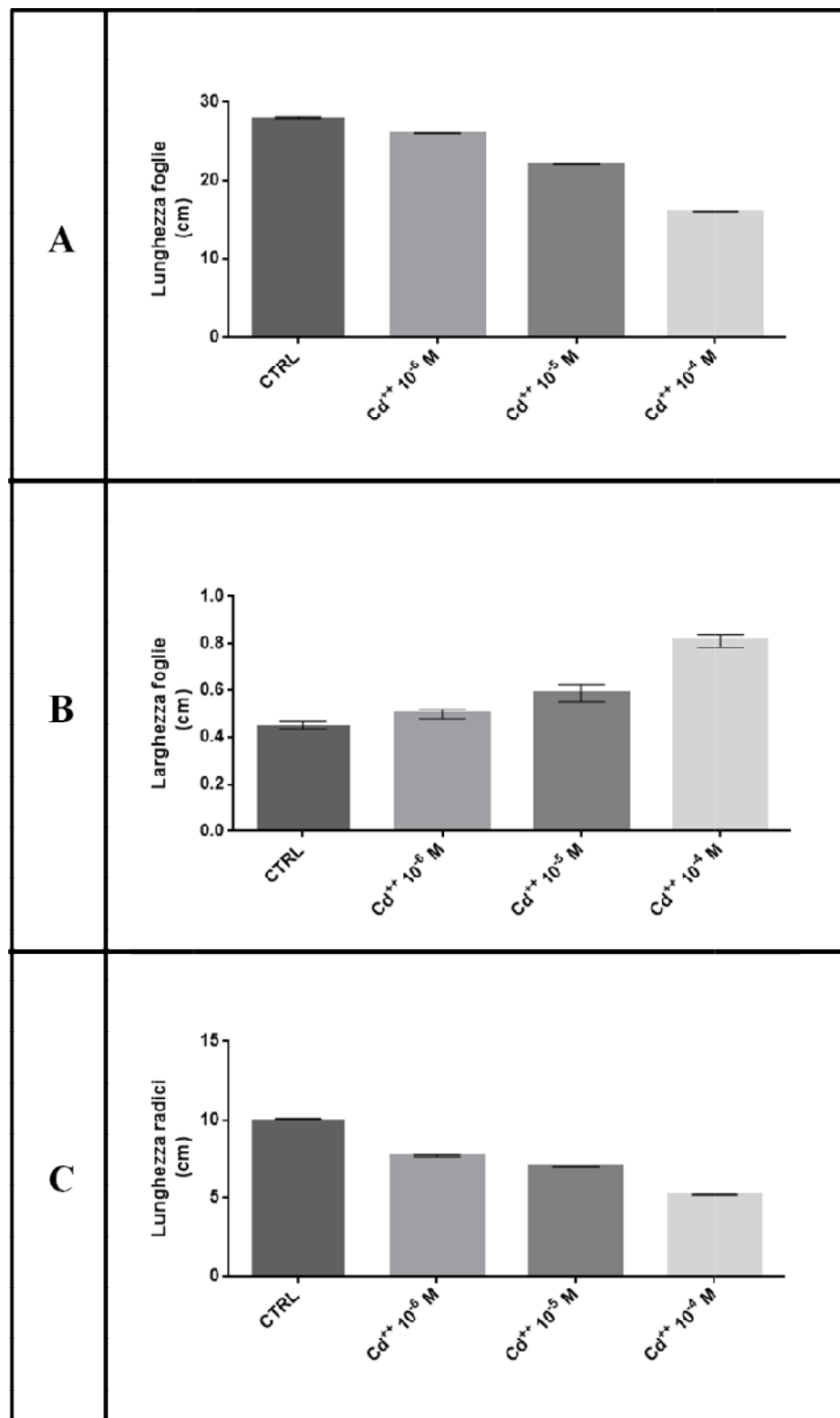


Fig. N°14: Effetti del cadmio su piante di orzo. Le misure della lunghezza (A) e larghezza (B) delle foglie, e (C) lunghezza della radice principale, sono state rilevate su piante di orzo cresciute in idrocoltura in condizioni di controllo (CTRL) ed esposte per 7 giorni a concentrazioni crescenti di cadmio. Le barre di errore indicano l'errore standard.

4.3. Determinazione della percentuale d'inibizione di crescita e del contenuto d'acqua

Lo stress da cadmio induce una inibizione della crescita delle piantine d'orzo con una conseguente diminuzione di biomassa (- 7,9%).

In particolare, è evidente una inibizione della crescita all'aumentare della concentrazione di cadmio.

Le piantine di orzo stressate alle diverse concentrazioni di cadmio differiscono, rispetto al controllo, anche per il contenuto di acqua.

In particolare, in associazione all'aumento della percentuale d'inibizione della crescita, vi è una diminuzione del contenuto di acqua (- 11,5%) in funzione all'aumento della concentrazione di cadmio.

Campioni	Peso (gr.)	Percentuale d'inibizione della crescita	Contenuto d'acqua (gr. H₂O/ gr DW)
Controllo	9,68 ± 0,04	0 ± 0,20	10,08 ± 0,215
Cd⁺⁺ 10⁻⁶ M	9,48 ± 0,028	2,07 ± 0,23	9,82 ± 0,137
Cd⁺⁺ 10⁻⁵ M	9,24 ± 0,01	4,54 ± 0,35	9,67 ± 0,235
Cd⁺⁺ 10⁻⁴ M	8,91 ± 0,015	7,95 ± 0,01	8,92 ± 0,424

4.4. Analisi ultrastrutturali (SEM)

I risultati ottenuti sono stati confermati dall'analisi di microscopia elettronica a scansione. In particolare, i campioni radici controllo mostrano peli radicali ben distanziati e una sezione di radice regolare (Fig. N°15A); la banda del Caspary è ben visibile, e circondata da un parenchima formato da pareti cellulari sottili (Fig. N°15B); inoltre, le cellule della banda del Caspary presentano una parete cellulare con spessore regolare su tutti i lati (Fig. N°15C), in modo da permettere una maggiore adesione tra plasmalemma e parete cellulare. Invece, le radici stressate con cadmio mostrano numerosi peli radicali (Fig. N°15D), e la struttura del cilindro vascolare è circondata da spesse pareti cellulari a livello dell'endoderme (Fig. N°15E). Le cellule del Caspary presentano una parete cellulare irregolare, con un lato più spesso e un lato sottile (Fig. N°15F).

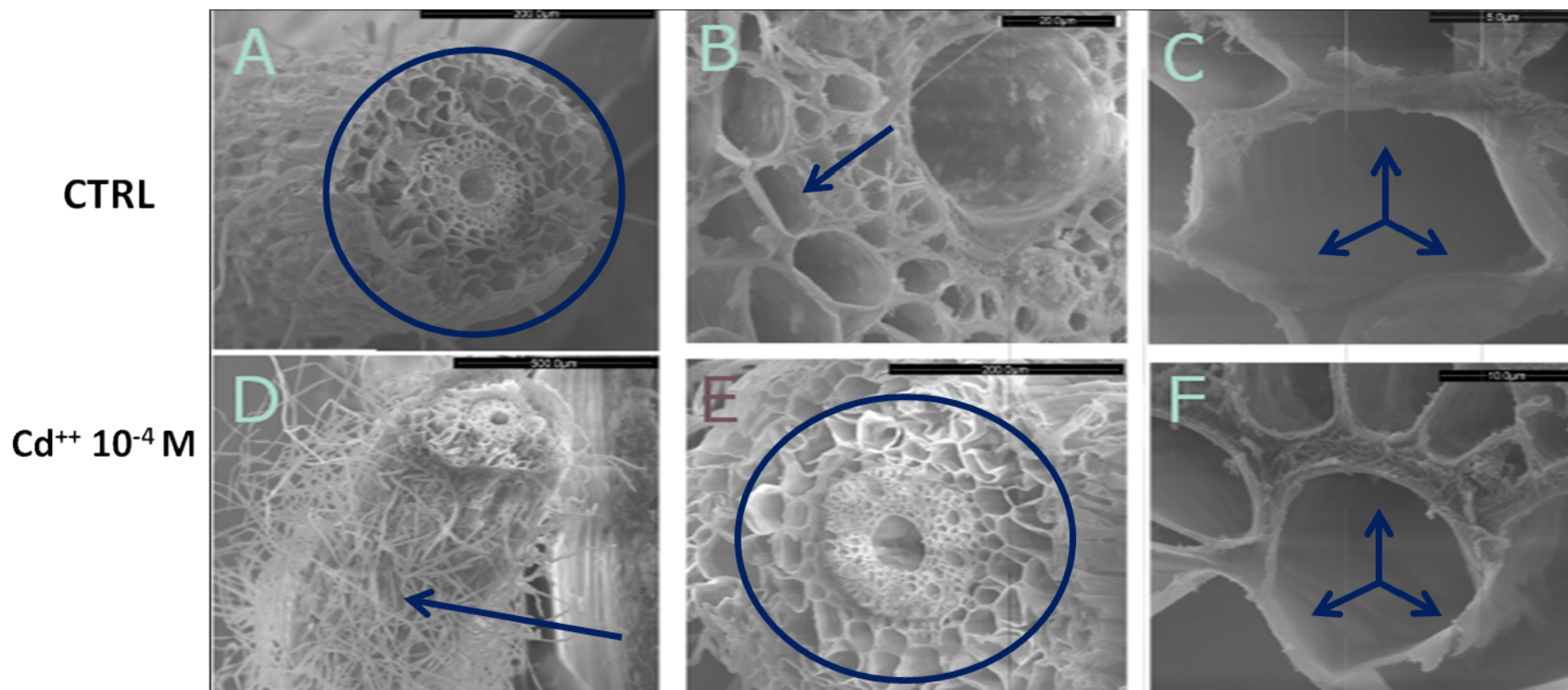


Fig. N°15: Osservazioni al SEM delle radici controllo e trattate con $\text{Cd}^{2+} 10^{-4} \text{ M}$. In particolare, i campioni radici controllo mostrano peli radicali ben distanziati e una sezione di radice regolare (A); la banda del Caspari è ben visibile (B) con parete cellulare con spessore regolare su tutti i lati (C). Le radici stressate con Cadmio mostrano numerosi peli radicali (D), struttura del cilindro vascolare alterata (E) e le cellule del Caspari con parete cellulare irregolare).

4.5. Analisi ultrastrutturali (TEM)

I campioni di orzo stressati da cadmio alle diverse concentrazioni, sono stati osservati mediante il microscopio elettronico a trasmissione.

Si osserva che la forma delle cellule del mesofillo è alterata in funzione dell'aumento della concentrazione di cadmio, risultato evidente anche dal cambiamento di localizzazione e distribuzione dei cloroplasti all'interno delle cellule (Fig. N°16A, B, C e D).

I cloroplasti presentano, inoltre, alterazioni ultrastrutturali evidenti quali, briglie citoplasmatiche (Fig. N°16I, L, M e N) e danni nell'organizzazione delle strutture tilacoidali in funzione dell'aumento della concentrazione di cadmio (Fig. N°16E, F, G, H).

Non si evidenziano alterazioni ultrastrutturali nelle altre strutture cellulari come nucleo, mitocondri, plasmodesmi e parete cellulare (Fig. N°17).

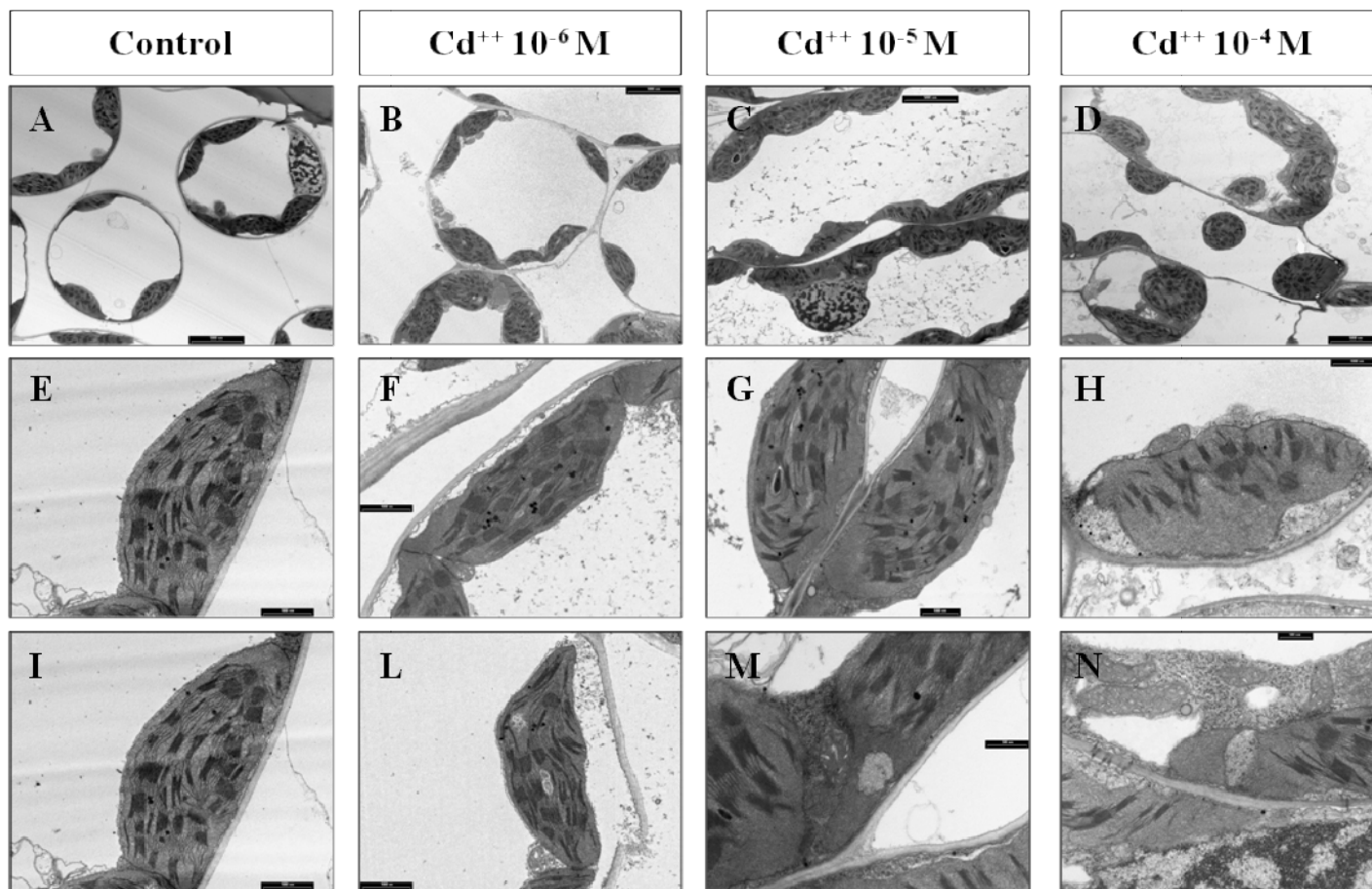


Fig. N°16: Osservazioni al TEM di campioni controllo e stressati alle diverse concentrazioni di cadmio di *Hordeum vulgare*. A: Forma cellulare del campione controllo; B: Forma cellulare di del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-6} \text{ M}$; C: Forma cellulare del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-5} \text{ M}$; D: Forma cellulare del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-4} \text{ M}$; E e I: Sezione di cloroplasti del campione controllo; F e L: Sezione di cloroplasti del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-6} \text{ M}$; G e M: Sezione di cloroplasti del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-5} \text{ M}$; H e N: Sezione di cloroplasti del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-4} \text{ M}$. Scale bars: $5 \mu\text{M}$.

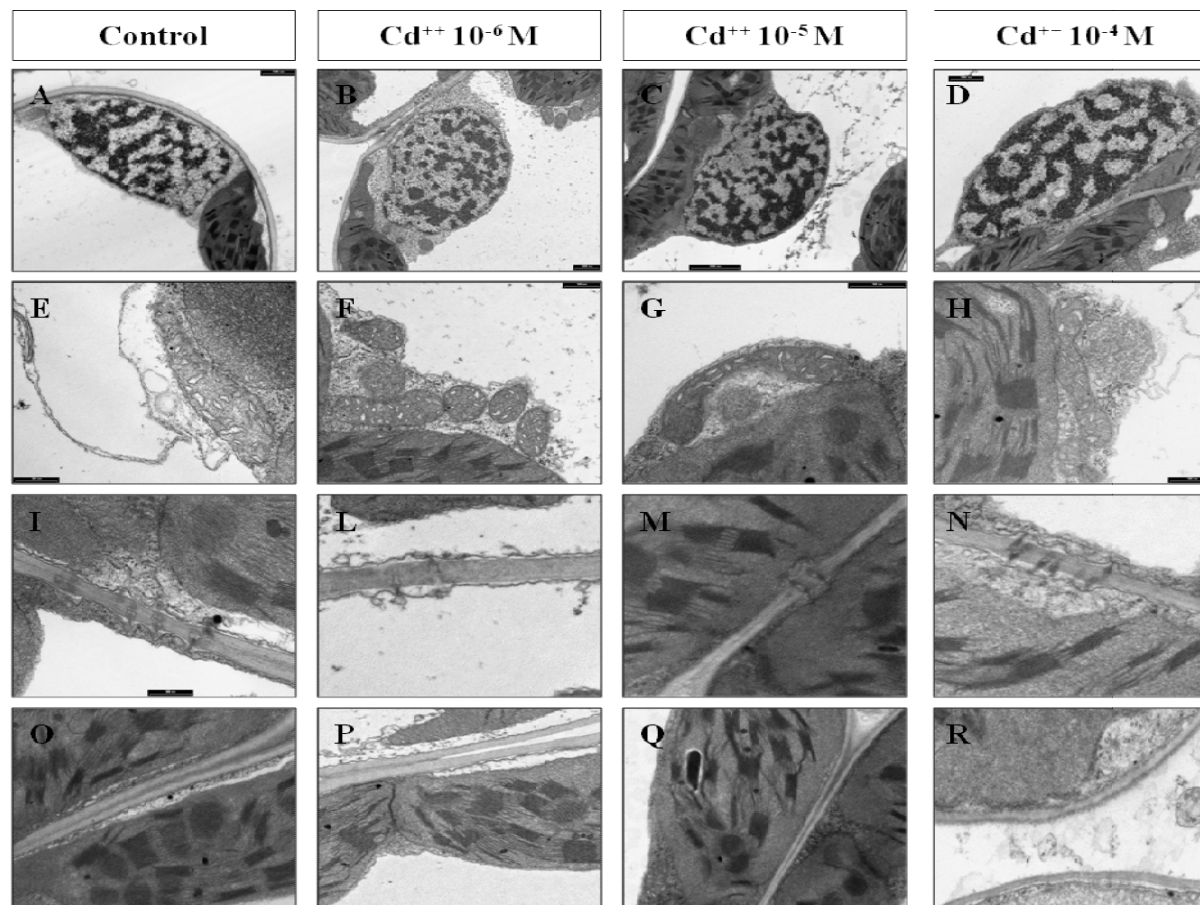


Fig. N°17: Osservazioni al TEM di campioni controllo e stressati alle diverse concentrazioni di cadmio di *Hordeum vulgare*. A: Nucleo del campione controllo; B: Nucleo di del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-6} \text{ M}$; C: Nucleo del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-5} \text{ M}$; D: Nucleo del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-4} \text{ M}$; E :Sezione di mitocondri del campione controllo; F: Sezione di mitocondri del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-6} \text{ M}$; G: Sezione di mitocondri del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-5} \text{ M}$; H: Sezione di mitocondri del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-4} \text{ M}$; I Sezione di plasmodesmi del campione controllo; L:Sezione di plasmodesmi del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-6} \text{ M}$; M: Sezione di plasmodesmi del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-5} \text{ M}$; N: Sezione di plasmodesmi del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-4} \text{ M}$; O:Sezione di parete cellulare del campione controllo; P: Sezione di parete cellulare del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-6} \text{ M}$; Q:Sezione del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-5} \text{ M}$; R:Sezione del campione $\text{Cd}^{++} 10^{-4} \text{ M}$., Scale bars: 5 μM .

4.6. Determinazione del contenuto di pigmenti fogliari

Le alterazioni ai centri di reazione sono confermate dalla determinazione delle quantità dei pigmenti. In particolare, come mostrato, si nota la diminuzione della clorofilla A (- 35%) e B (- 27%) e dei carotenoidi (- 41%) in funzione dell'aumento della concentrazione di cadmio (Fig. N°18).

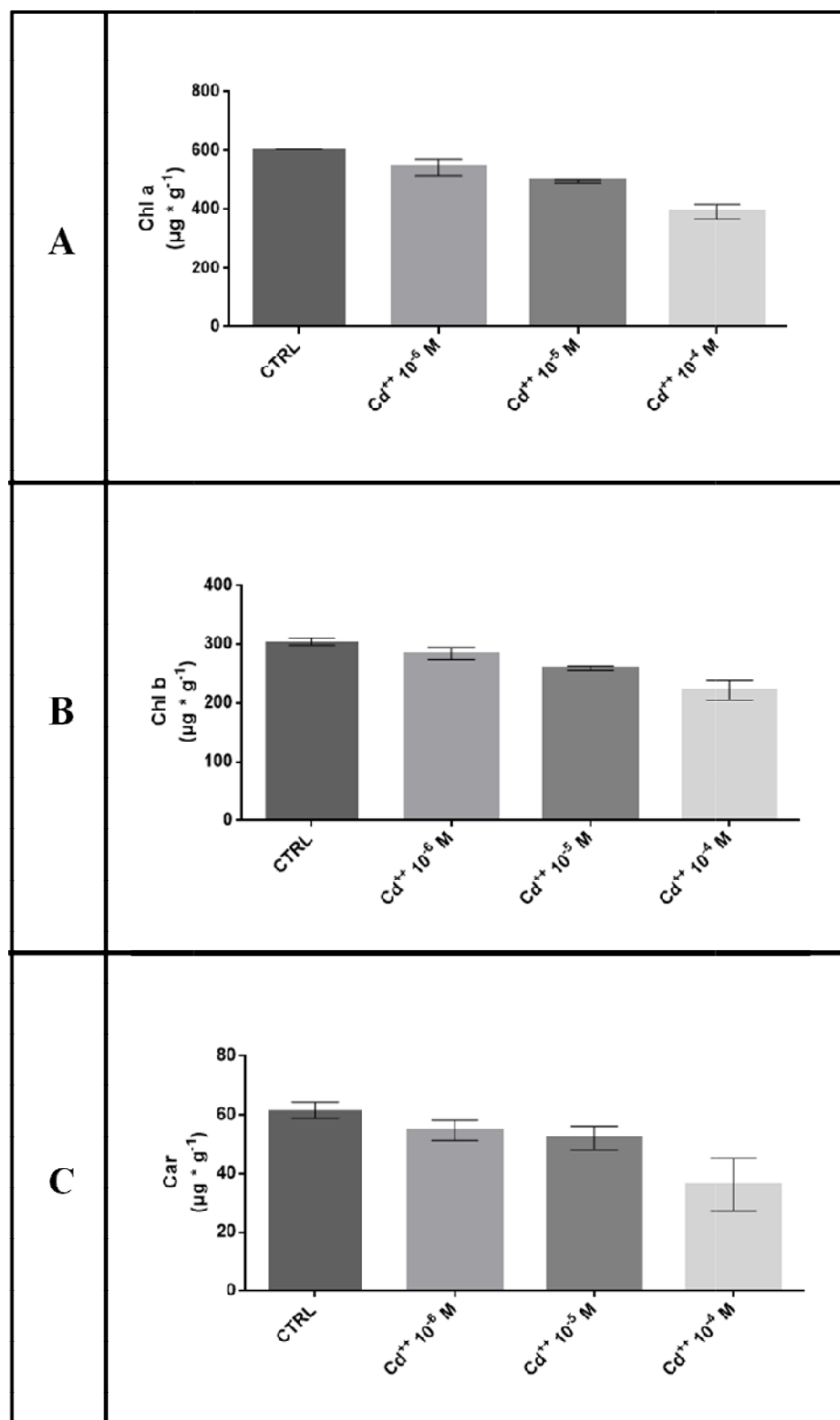


Fig. N°18: Effetti del cadmio sul contenuto di clorofilla a (A), clorofilla b (B) e carotenoidi (C) di piante di orzo cresciute in idrocoltura in condizioni di controllo (CTRL) ed esposte per 7 giorni a concentrazioni crescenti di cadmio. Le barre di errore indicano l'errore standard.

4.7. Determinazione dei principali indici fotochimici

L'alterazione della struttura tilacoidale dei cloroplasti nei campioni trattati con cadmio può essere responsabile della riduzione dell'efficienza fotosintetica riscontrata nelle foglie esposte alla più elevata concentrazione di cadmio. I parametri fotochimici esaminati indicano che l'efficienza di conversione della luce ai centri di reazione del PSII non sembra essere compromessa fino al trattamento con $\text{Cd}^{++} 10^{-5} \text{ M}$, indicando una buona resistenza da parte dell'apparato fotosintetico. Il trattamento $\text{Cd}^{++} 10^{-4} \text{ M}$ determina invece una riduzione significativa delle reazioni fotochimiche che trovano riscontro nell'abbassamento di F_v/F_m , QY e ETR, indicando importanti perturbazioni a livello dei centri di reazione. Al contempo, tutti i trattamenti con cadmio stimolano nelle foglie un incremento dei processi di dissipazione termica dell'energia luminosa assorbita. Tuttavia è opportuno considerare che date le condizioni di irradianza non eccessive per i fotosistemi (circa 150 PPFD) alle quali sono cresciute le piante, l'indice NPQ si mantiene comunque basso in valore assoluto.

Campioni	F_v/F_m	QY	ETR	NPQ
Controllo	$0,787 \pm 0,004$	$0,748 \pm 0,013$	$36,71 \pm 1,455$	$0,075 \pm 0,016$
$\text{Cd}^{++} 10^{-6} \text{ M}$	$0,777 \pm 0,004$	$0,742 \pm 0,006$	$35,22 \pm 1,719$	$0,169 \pm 0,046$
$\text{Cd}^{++} 10^{-5} \text{ M}$	$0,762 \pm 0,016$	$0,740 \pm 0,009$	$33,87 \pm 0,855$	$0,1678 \pm 0,017$
$\text{Cd}^{++} 10^{-4} \text{ M}$	$0,710 \pm 0,011$	$0,685 \pm 0,008$	$32,39 \pm 0,99$	$0,179 \pm 0,021$

4.8. Determinazione del contenuto di amido

L'accumulo di amido può essere utilizzato come un indicatore della efficienza fotosintetica, e la sua diminuzione un sensore degli effetti dello stress da cadmio.

In particolare si nota come l'accumulo di amido diminuisce (- 48,6%) in funzione dell'aumento della concentrazione di cadmio (Fig. N°19).

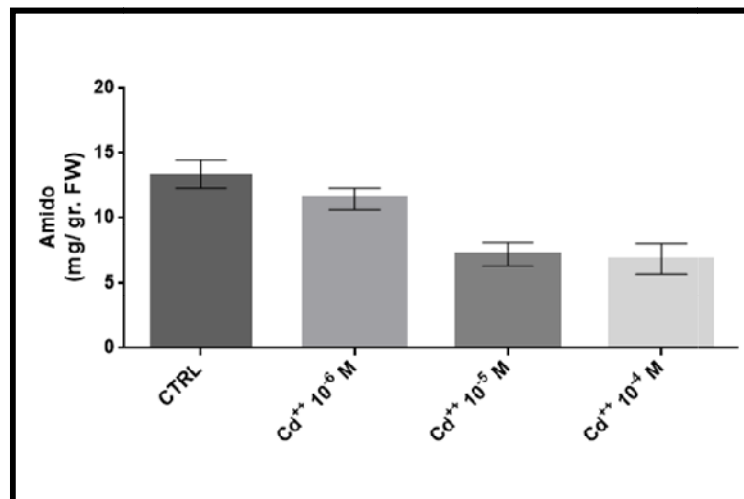


Fig. N°19 : Effetti del cadmio sul contenuto di amido in piante di orzo cresciute in idrocoltura in condizioni di controllo (CTRL) ed esposte per 7 giorni a concentrazioni crescenti di cadmio. Le barre di errore indicano l'errore standard.

4.9. Analisi dei livelli delle HSP70

I campioni erano prelevati e sottoposti alla tecnica del Western blotting con anticorpi anti-HSP70 in grado di discriminare le diverse isoforme compartimentate.

I risultati ottenuti mostrano come i livelli dell'isoforma citosolica delle HSP70 aumentano in funzione dell'incremento della concentrazione di cadmio, mentre diminuisce in funzione del tempo di esposizione al metallo, sia in foglie che in radici (Fig. N°20A).

Lo stesso andamento, in foglie e radici, si osserva anche per l'isoforma cloroplastica delle HSP70, la cui presenza risulta essere più bassa rispetto alla isoforma citosolica (Fig. N°20B).

I livelli dell'isoforma mitocondriale delle HSP70 mostrano un andamento contrario, in foglie e radici, rispetto alle altre due isoforme: i livelli diminuiscono in funzione dell'aumento della concentrazione di cadmio e diminuiscono in funzione al tempo di esposizione (Fig. N°20C).

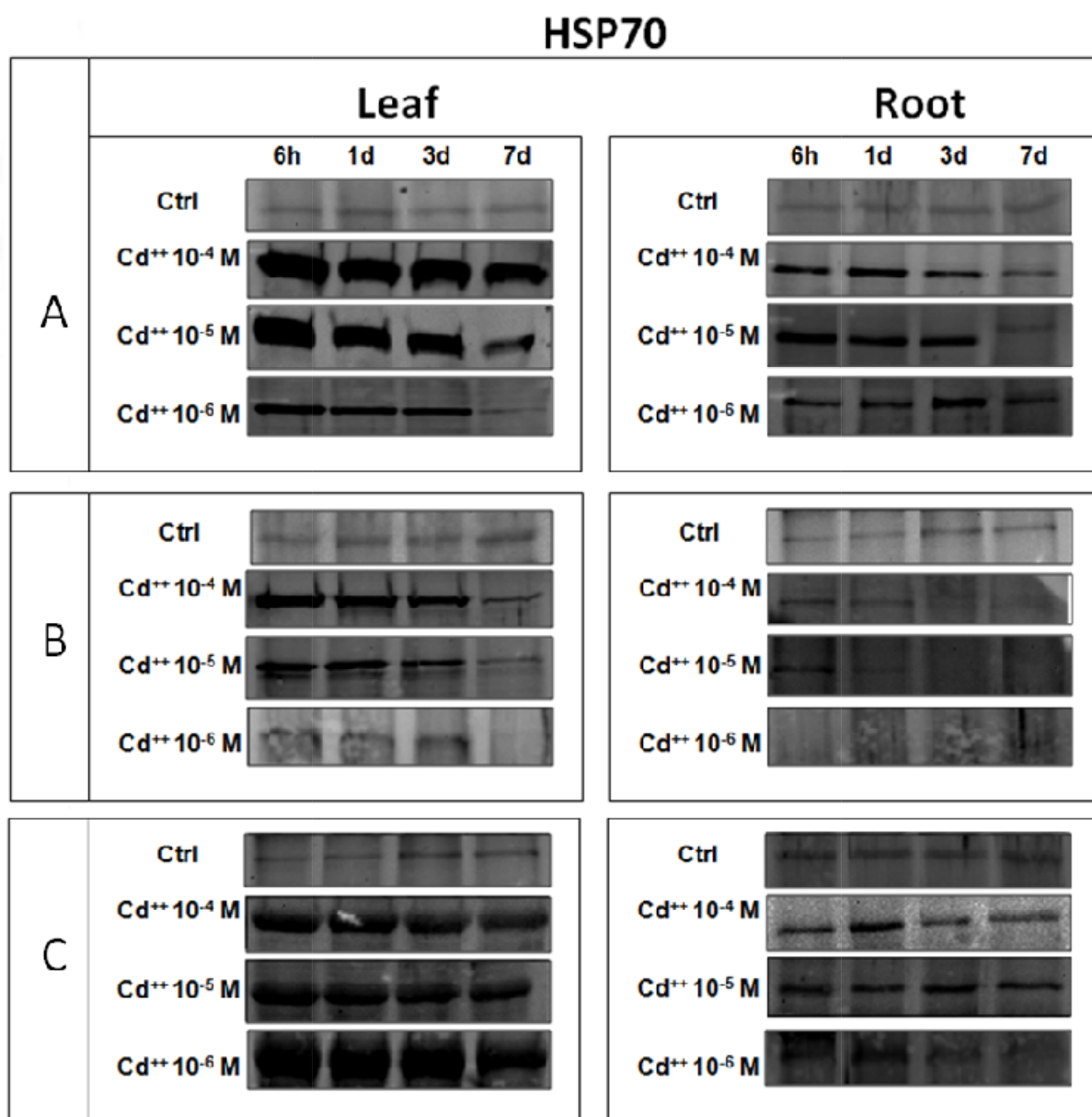


Fig. N°20: Western blots dell'estratto crudo di *Hordeum vulgare* esposte per 7 giorni a differenti concentrazioni di cadmio (Cd). Pannello A: Livelli dell'isoforma citosolica delle HSP70, in foglie e radici; Pannello B: Livelli dell'isoforma plastidiale delle HSP70, in foglie e radici; Pannello C: Livelli dell'isoforma mitocondriale delle HSP70, in foglie e radici.

4.10. Analisi dei livelli della Rubisco e della proteina D1

I risultati ottenuti mostrano come i livelli della Rubisco e della proteina D1 non sono influenzati dal cadmio (Fig. N°21), al contrario dell'effetto tossico espletato nella biosintesi della clorofilla, sui centri di reazione e nella catena di trasporto degli elettroni del PSII.

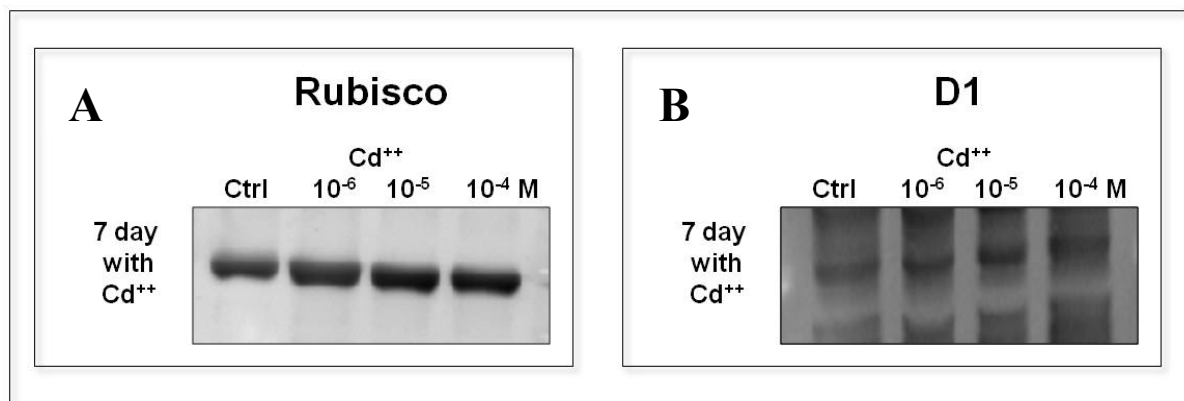


Fig. N°21: Western blots dell'estratto crudo di foglie di *Hordeum vulgare* esposte per 7 giorni a differenti concentrazioni di cadmio (Cd). Pannello A: Livelli di rubisco in condizioni di controllo (CTRL) ed esposte per 7 giorni a concentrazioni crescenti di cadmio; Pannello B: Livelli di D1 in condizioni di controllo (CTRL) ed esposte per 7 giorni a concentrazioni crescenti di cadmio.

4.11. Determinazione dei livelli e dell'attività della G6PDH

I risultati ottenuti mostrano come i livelli, nelle foglie, della isoforma Cyt della G6PDH rimangono invariati sotto stress da cadmio, invece i livelli dell'isoforma P2 aumentano alla concentrazione di cadmio più alta adoperata (10^{-4} M), mentre i livelli dell'isoforma P1 presentano un andamento contrario rispetto l'isoforma P2 (Fig. N°22A); inoltre, non si osservano variazioni significative delle due isoforme a livello radicale (Fig. N°22B); L'effetto del cadmio si realizza con una lieve riduzione dell'attività enzimatica della G6PDH, sia in foglie che radici, in funzione dell'aumento della concentrazione di cadmio (Fig. N°23).

Campioni	Attività G6PDH nelle radici (nmol*min ⁻¹ *ml ⁻¹ /mg prot.)	Attività G6PDH nelle foglie (nmol*min ⁻¹ *ml ⁻¹ / mg prot.)
Controllo	170 ± 0,842	28,3 ± 0,23
Cd ⁺⁺ 10 ⁻⁶ M	151 ± 1,272	27,9 ± 0,367
Cd ⁺⁺ 10 ⁻⁵ M	146 ± 0,661	27 ± 0,443
Cd ⁺⁺ 10 ⁻⁴ M	142 ± 1,027	26 ± 0,58

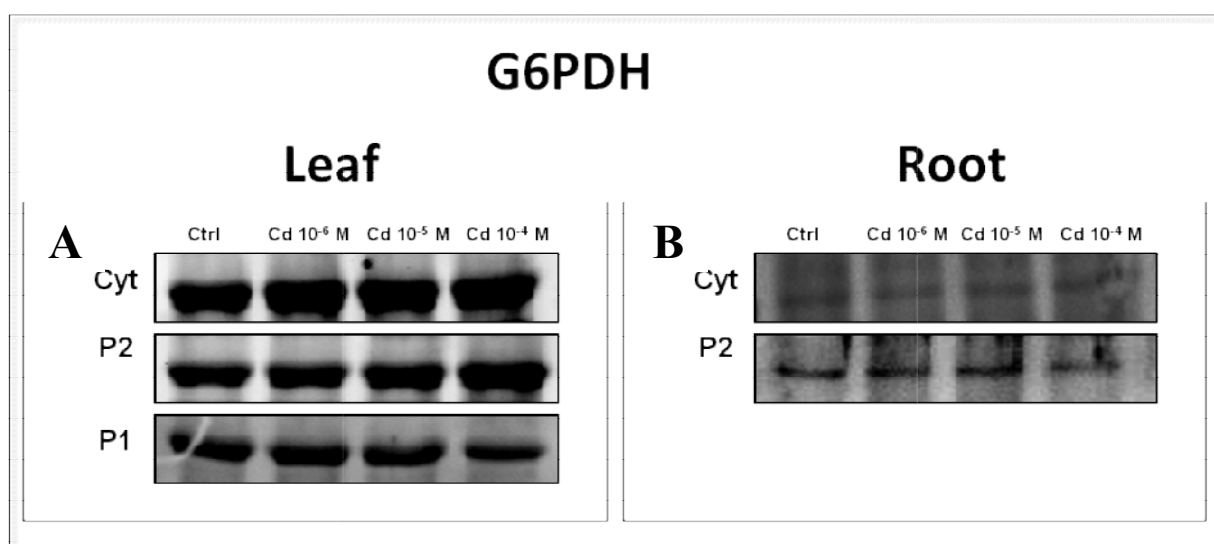


Fig. N°22: Western blots dell'estratto crudo di *Hordeum vulgare* esposte per 7 giorni a differenti concentrazioni di cadmio (Cd). Pannello A: Livelli delle isoforme, cyt, P2 e P1, di G6PDH nelle foglie in condizioni di controllo (CTRL) ed esposte per 7 giorni a concentrazioni crescenti di cadmio; Pannello B: Livelli delle isoforme, cyt e P2, di G6PDH nelle radici in condizioni di controllo (CTRL) ed esposte per 7 giorni a concentrazioni crescenti di cadmio.

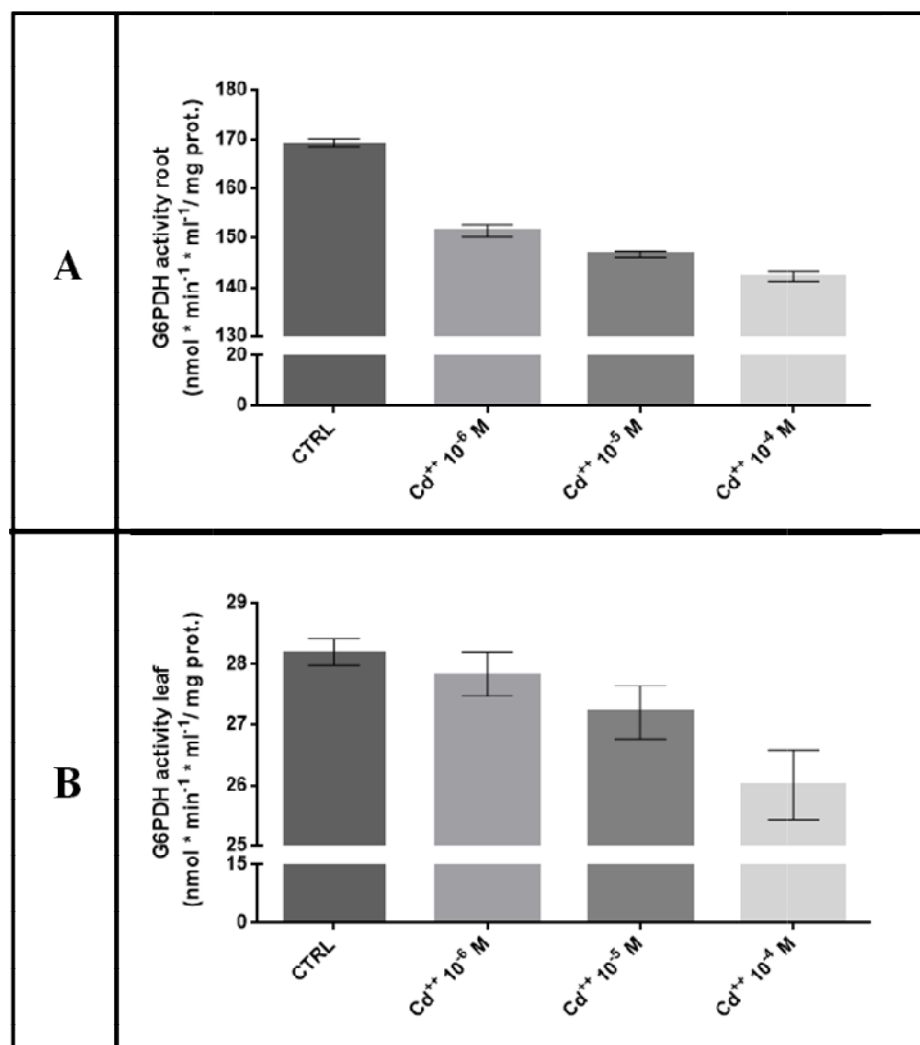


Fig. N°23: Effetti del Cadmio sull'attività enzimatica, in radici (A) e foglie (B), della G6PDH in piante di orzo cresciute in idrocoltura in condizioni di controllo (CTRL) ed esposte per 7 giorni a concentrazioni crescenti di Cadmio. Le barre di errore indicano l'errore standard.

4.12. Determinazione dell'attività della nitrato reduttasi

La ristrutturazione funzionale dell'apparato radicale è anche confermato dall'attività della nitrato reduttasi, enzima principale nell'assimilazione dell'azoto. In particolare, si nota come l'attività della nitrato reduttasi aumenta in funzione della concentrazione di cadmio, suggerendo che la attività sia correlata all'aumento della superficie di assorbimento determinata dall'incremento del numero di radici laterali (Fig. N°24).

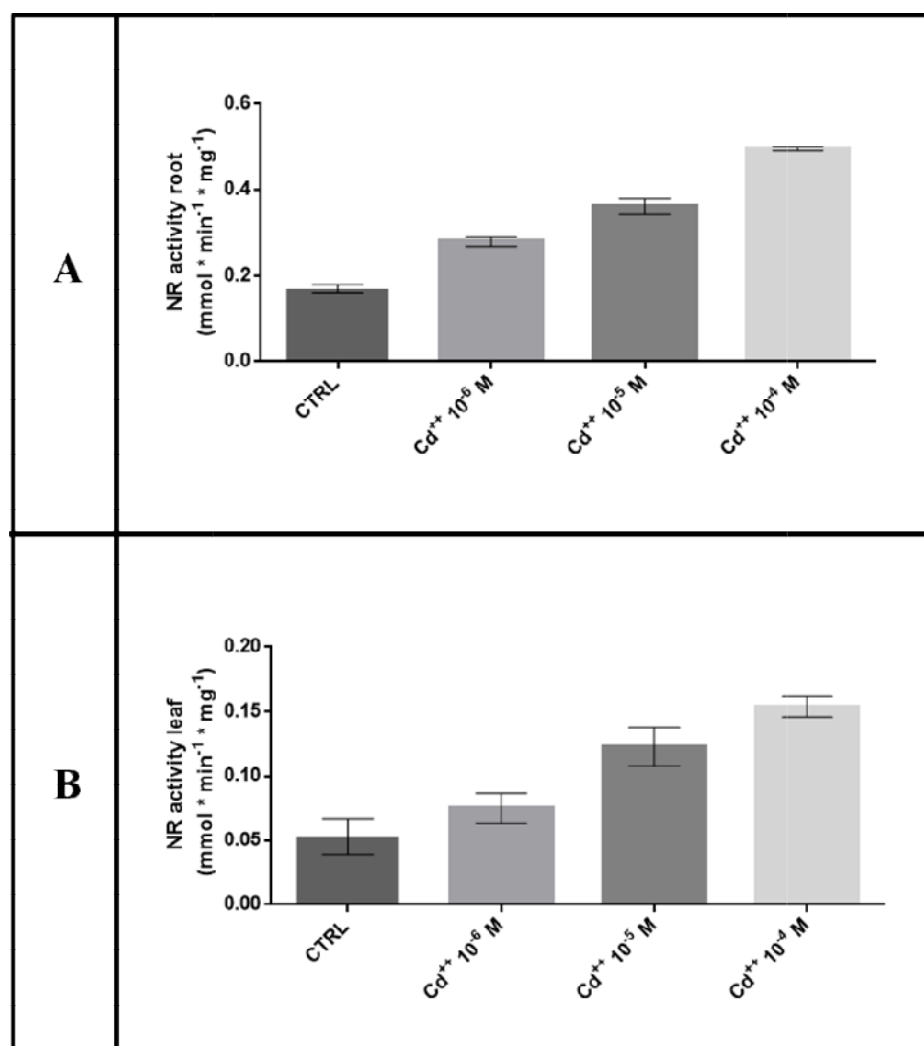


Fig. N°24: Effetti del cadmio sull'attività enzimatica, in radici (A) e foglie (B), della NR in piante di orzo cresciute in idrocoltura in condizioni di controllo (CTRL) ed esposte per 7 giorni a concentrazioni crescenti di cadmio. Le barre di errore indicano l'errore standard.

4.13. Contenuto di amminoacidi liberi

I risultati ottenuti mostrano come il cadmio influisca anche sul profilo amminoacidico, sia nelle foglie che nelle radici, delle piantine d'orzo.

Di particolare interesse fisiologico risultano essere gli amminoacidi come il glutammato, la glutammina, l'aspartato e l'asparagina, coinvolti nel processo di assimilazione dell'azoto, e la glicina, la serina e l'alanina, coinvolti nel processo di fotorespirazione.

In particolare nelle foglie i livelli del glutammato aumentano fino a cadmio 10^{-5} M (+ 36%), mentre nelle radici i livelli di glutammato raddoppiano rispetto al controllo alla concentrazione di 10^{-4} M.

I livelli di glutammina, nelle foglie, si dimezzano sostanzialmente in seguito alla esposizione al cadmio, mentre rimangono sostanzialmente invariati nelle radici.

I livelli di aspartato rimangono invariati sia in foglie che nelle radici, mentre la asparagina subisce un aumento (+ 50%) nelle foglie e un dimezzamento nelle radici.

I livelli di serina, glicina e alanina rimangono sostanzialmente stabili nelle foglie, mentre nelle radici si osserva un forte aumento della glicina di tre volte a 10^{-4} M, e della alanina (+ 50%) all'esposizione al cadmio.

Un forte aumento di ornitina si osserva nelle foglie a 10^{-5} M.

Nelle radici si osserva anche un forte aumento di ornitina e citrullina a 10^{-4} M.

Foglie	Controllo ($\mu\text{mol/Gr.FW}$)	$\text{Cd}^{++} 10^{-6} \text{ M}$ ($\mu\text{mol/Gr.FW}$)	$\text{Cd}^{++} 10^{-5} \text{ M}$ ($\mu\text{mol/Gr.FW}$)	$\text{Cd}^{++} 10^{-4} \text{ M}$ ($\mu\text{mol/Gr.FW}$)
ASP	1,57 \pm 0,090	1,52 \pm 0,061	1,25 \pm 0,032	1,49 \pm 0,104
GLU	0,36 \pm 0,016	0,37 \pm 0,004	0,49 \pm 0,010	0,41 \pm 0,0262
ASN	12,65 \pm 0,851	16,15 \pm 0,642	13,62 \pm 0,648	19,53 \pm 0,986
SER	0,94 \pm 0,020	0,81 \pm 0,029	0,90 \pm 0,023	0,92 \pm 0,076
GLN	1,23 \pm 0,608	0,66 \pm 0,018	0,71 \pm 0,042	0,65 \pm 0,033
HIS	0,44 \pm 0,020	0,36 \pm 0,011	0,47 \pm 0,022	0,54 \pm 0,030
GLY	0,04 \pm 0,003	0,03 \pm 0,003	0,05 \pm 0,0008	0,04 \pm 0,003
THR	0,45 \pm 0,026	0,37 \pm 0,010	0,42 \pm 0,018	0,41 \pm 0,023
ARG	0,41 \pm 0,024	0,21 \pm 0,010	0,34 \pm 0,019	0,52 \pm 0,026
ALA	0,70 \pm 0,095	0,51 \pm 0,015	0,70 \pm 0,040	0,72 \pm 0,044
TYR	0,04 \pm 0,0002	0,02 \pm 0,0002	0,02 \pm 0,0002	0,02 \pm 0,0001
VAL	0,27 \pm 0,101	0,16 \pm 0,015	0,16 \pm 0,009	0,24 \pm 0,059
TRP	0,36 \pm 0,148	0,23 \pm 0,027	0,31 \pm 0,114	0,26 \pm 0,067
PHE	0,17 \pm 0,025	0,08 \pm 0,006	0,15 \pm 0,029	0,10 \pm 0,023
ILE	0,12 \pm 0,084	0,14 \pm 0,009	0,12 \pm 0,050	0,11 \pm 0,030
LEU	0,14 \pm 0,032	0,09 \pm 0,005	0,18 \pm 0,061	0,13 \pm 0,026
LIS	2,26 \pm 0,253	1,46 \pm 0,059	1,92 \pm 0,401	1,99 \pm 0,058
CIT	0,03 \pm 0,001	0,03 \pm 0,0009	0,04 \pm 0,002	0,02 \pm 0,0007
ORN	0,29 \pm 0,113	0,36 \pm 0,116	0,78 \pm 0,102	0,40 \pm 0,102
Tot	22,47	23,56	22,63	28,5
Radici	Controllo ($\mu\text{mol/Gr.FW}$)	$\text{Cd}^{++} 10^{-6} \text{ M}$ ($\mu\text{mol/Gr.FW}$)	$\text{Cd}^{++} 10^{-5} \text{ M}$ ($\mu\text{mol/Gr.FW}$)	$\text{Cd}^{++} 10^{-4} \text{ M}$ ($\mu\text{mol/Gr.FW}$)
ASP	0,87 \pm 0,093	1,31 \pm 0,105	0,96 \pm 0,085	0,93 \pm 0,046
GLU	0,13 \pm 0,084	0,25 \pm 0,016	0,18 \pm 0,015	0,26 \pm 0,017
ASN	4,23 \pm 0,154	5,33 \pm 0,373	4,04 \pm 0,3845	2,5 \pm 0,145
SER	0,27 \pm 0,005	0,27 \pm 0,031	0,17 \pm 0,066	0,28 \pm 0,010
GLN	2,35 \pm 0,072	3,33 \pm 0,241	2,13 \pm 0,187	2,50 \pm 0,160
HIS	0,20 \pm 0,009	0,24 \pm 0,009	0,19 \pm 0,001	0,30 \pm 0,031
GLY	0,05 \pm 0,0005	0,05 \pm 0,003	0,04 \pm 0,0004	0,16 \pm 0,019
THR	0,15 \pm 0,002	0,17 \pm 0,010	0,13 \pm 0,010	0,08 \pm 0,004
ARG	0,14 \pm 0,014	0,09 \pm 0,006	0,14 \pm 0,010	0,16 \pm 0,007
ALA	1,65 \pm 0,104	3,01 \pm 0,298	2,43 \pm 0,293	2,43 \pm 0,247
TYR	0,02 \pm 0,0001	0,03 \pm 0,0001	0,02 \pm 0,0002	0,03 \pm 0,0003
VAL	0,14 \pm 0,021	0,13 \pm 0,011	0,10 \pm 0,009	0,28 \pm 0,128
TRP	0,41 \pm 0,074	0,58 \pm 0,146	0,57 \pm 0,097	0,60 \pm 0,576
PHE	0,19 \pm 0,029	0,15 \pm 0,023	0,16 \pm 0,010	0,39 \pm 0,078
ILE	0,10 \pm 0,048	0,10 \pm 0,055	0,10 \pm 0,052	0,34 \pm 0,086
LEU	0,12 \pm 0,033	0,13 \pm 0,033	0,10 \pm 0,031	0,16 \pm 0,031
LIS	1,53 \pm 0,329	1,34 \pm 0,241	1,63 \pm 0,389	1,42 \pm 0,547
CIT	0,03 \pm 0,001	0,03 \pm 0,0009	0,03 \pm 0,001	0,07 \pm 0,035
ORN	0,48 \pm 0,146	0,44 \pm 0,136	0,44 \pm 0,168	1,38 \pm 0,181
Tot	13,0989	17,0069	13,5901	14,2954

5. DISCUSSIONE

L'inquinamento da metalli pesanti è uno dei principali problemi degli ecosistemi naturali e il cadmio in particolare suscita grande preoccupazione, perché la sua presenza nell'ambiente, anche in tracce, può causare seri problemi agli organismi viventi, e il suo bio-accumulo nella catena alimentare può essere altamente dannosa.

Le piante, in quanto organismi sessili, al variare delle condizioni ideali per il proprio sviluppo entrano in una status di difficoltà nello svolgere le principali attività biologiche, entrano quindi in una condizione definita di stress che può essere suddivisa in due grandi categorie: **stress abiotici, come lo stress da cadmio**, che insorgono all'instaurarsi di un eccesso o da una carenza dei fattori chimici e fisici che determinano le caratteristiche dell'ambiente in cui vive la pianta e gli **stress biotici** determinati da altri organismi viventi, ad es. patogeni.

Tra gli organismi utili per studiare la risposta allo stress da cadmio, l'orzo rappresenta una specie vegetale idonea in quanto rappresenta un cereale che ben si adatta alla scarsità di acqua e rappresenta una specie resistente più di altre (es. grano) allo stress salino, ed è quindi presumibile che questa specie presenti sistemi di contrasto degli stress abiotici ben specializzati (*Cardi et al., 2015; Landi et al., 2016*).

L'analisi delle risposte su base micro e macroscopica, fisiologica, ecologica e biochimica, di piantine d'orzo sottoposte a stress da cadmio può fornire

importanti informazioni sui meccanismi di risposta e tolleranza all'inquinamento da metalli pesanti nei cereali e nelle piante coltivate in generale.

Tra i vari parametri pedologici che influenzano la disponibilità del cadmio, il pH del terreno è considerato il più importante; infatti, la diminuzione del pH del terreno porta ad una concentrazione crescente di cadmio nelle piante (*Kirkham et al., 2006*). Tra i principali fattori responsabili dell'accumulo di cadmio non sono solo la quantità di cadmio e il pH, ma anche la quantità di carbonio organico presente nel suolo ed ovviamente anche il genotipo della pianta; inoltre, l'assorbimento degli ioni cadmio compete con quella di elementi come Zn, Ca, Mg, K, P, Cl⁻ e Cu (*Oporto et al., 2009; Kudo et al., 2011*).

Negli esperimenti eseguiti, le distorsioni morfogenetiche in piantine d'orzo esposte al CdCl₂, per sette giorni alle concentrazioni 10⁻⁶, 10⁻⁵ e 10⁻⁴ M, sono visibilmente riscontrabili in funzione dell'incremento della concentrazione del metallo pesante, caratterizzate da difformità di crescita, di colore e di turgidità fogliare correlata con una riduzione della lunghezza delle foglie (- 42,65%) a favore di un aumento della larghezza (+ 80%), mentre l'apparato radicale va incontro ad una ristrutturazione, in funzione dell'incremento di cadmio, caratterizzato dalla diminuzione della lunghezza delle radici primarie (- 48,5%), a favore di un numero maggiore di radici secondarie; inoltre, le piantine d'orzo differiscono anche nella biomassa (- 7,9%) e nell'inibizione della crescita.

Tutti i cambiamenti metabolici prodotti dal cadmio modificano drasticamente la crescita e lo sviluppo delle piante; infatti, le distorsioni morfogenetiche sono un sintomo non specifico degli effetti esercitati da diversi fattori di stress, utili per valutare la fitotossicità di questi fattori.

Il cadmio è assorbito nelle piante principalmente dal terreno attraverso il sistema radicale, dove sulla superficie della radice si lega ai gruppi carbossilici degli acidi uronici della mucillagine che ha la funzione di limitare l'assorbimento del metallo, stabilendo una barriera per proteggere l'apparato radicale. In seguito, alcuni di questi ioni legati dalla mucillagine, saranno rilasciati quando la mucillagine sarà biodegradata (*Yang e Pan et al., 2013*) e in misura minore entrano nelle piante anche attraverso le foglie, dove la capacità della foglia di assorbire tali ioni dipende notevolmente dalla sua morfologia (*Godzik et al., 1993*).

Il cadmio, assorbito tramite le radici, si localizza in molti organi e tessuti, in particolare, se le radici sono il massimo sito di assorbimento di cadmio, le foglie rappresentano il sito preferenziale d'accumulo (*Zheljazkov et al., 1996*): il cadmio è accumulato in diverse regioni della foglia, che corrispondono alle zone metabolicamente meno attive, che diverranno successivamente necrotiche, poiché nelle piante esiste un metabolismo attivo con la funzione di detossificare il cadmio (*Cosio et al., 2005*); infatti, entrando nella cellula, gli ioni cadmio si legano a piccoli peptidi contenenti cisteina denominati fitochelatine (PC)

mediante i loro gruppi –SH. La presenza di fitochelatine nella detossificazione delle piante sottoposte a stress da cadmio è considerata un meccanismo importante e sembra essere organo-dipendente; infatti, si è osservato che nelle radici iperaccumulatrici del *Sedum alfredii* questo meccanismo basato sulle fitochelatine è poco utilizzato, mentre nei germogli della stessa pianta questo processo è utilizzato.

Quando le radici assorbono il cadmio, esso si accumula soprattutto nel rizoderma e nella corteccia delle radici, una quantità notevole di cadmio si riscontra a livello dei peli radicali, quindi la corteccia funge da seconda barriera nel difendere le piante dagli effetti tossici del cadmio ma quando vi sono concentrazioni letali, gli ioni cadmio attraversano la corteccia e l'endoderma e si trovano in notevoli quantità nelle cellule del cilindro vascolare. Negli esperimenti eseguiti su *Hordeum vulgare* esposto a diversi livelli di Cadmio la microscopia elettronica a scansione trasmissione (TEM) ha mostrato che i campioni di radici controllo mostrano peli radicali ben distanziati e una sezione di radice regolare, la banda del Caspary è ben visibile con parete cellulare a spessore regolare su tutti i lati, in modo da permettere una maggiore adesione tra plasmalemma e parete cellulare, ed è circondata da un parenchima formato da pareti cellulari sottili. Invece le radici esposte al cadmio mostrano numerosi peli radicali, la struttura del cilindro vascolare è circondata da spesse pareti cellulari

a livello dell'endoderme e le cellule del Caspary presentano una parete cellulare irregolare, con un lato più spesso e un lato sottile.

L'assorbimento del metallo nel germoglio è un processo controllato (*Vodnik et al., 1999*): quando il cadmio entra nello xilema con il trasporto radiale, alcuni degli ioni sono trasportati al germoglio mediante la linfa dello xilema, dove un possibile veicolante del cadmio potrebbe essere l'acido citrico della linfa xilematica (*Senden et al., 1995*).

A livello intracellulare, concentrazioni relativamente elevate di cadmio sono state riscontrate nella parete cellulare in molte specie; infatti, i metalli pesanti favoriscono la deposizione di callosio e di suberina che frena l'assorbimento dei metalli pesanti stessi (*Piršelová et al., 2012*). Inoltre, una parte considerevole di metalli pesanti assorbiti rimane come aggregati globulari sulla superficie esterna del plasmalemma e, quindi, sono esclusi dal citoplasma ma alcuni ioni cadmio raggiungono il citoplasma (*Wierzbicka et al., 1984*) esercitando effetti tossici su organelli come i nuclei, i cloroplasti e i mitocondri; infatti, in *Hordeum vulgare* mediante microscopia a scansione, sono stati osservati alterazioni nella forma cellulare e nella localizzazione e distribuzione dei cloroplasti all'interno delle cellule del mesofillo; inoltre, i cloroplasti presentano anche alterazioni ultrastrutturali evidenti quali briglie citoplasmatiche e danni nell'organizzazione delle strutture tilacoidali; tutte queste alterazioni evidenziate incrementano in funzione dell'aumento della concentrazione di cadmio, mentre non si

evidenziano alterazioni ultrastrutturali nel nucleo, nei mitocondri, nei plasmodesmi e nella parete cellulare.

A livello intracellulare, inoltre, il cadmio interagisce con numerosi enzimi, in genere inibendo la loro attività almeno del 50% in un range di concentrazioni da 10^{-6} a 3×10^{-5} M. Nella maggior parte dei casi, l'inibizione esercitata dal cadmio, è il risultato dell'interazione tra gli ioni cadmio e i gruppi –SH essenziali per il centro di reazione e per la stabilizzazione della struttura terziaria dell'enzima (*Kositsin et al., 1991*).

In altri casi, il cadmio può promuovere alcune attività enzimatiche, anche se non è chiaro se il cadmio influenzi direttamente le attività enzimatiche o se tale stimolazione è il risultato di cambiamenti nella sintesi degli enzimi, oppure determinato dall'immobilizzazione di inibitori (*Uraguchi et al., 2009*); infatti, dagli esperimenti eseguiti su *Hordeum vulgare* esposto a diversi livelli di cadmio è emerso che questo metallo induce alterazioni nel contenuto e nell'attività di alcuni enzimi e proteine del metabolismo basale della cellula vegetale (Rubisco, D1, G6PDH e NR). In particolare, i livelli della Rubisco e della proteina D1 non sono influenzati dal cadmio, mentre i risultati mostrano una forte influenza del cadmio sulla biosintesi della clorofilla, e sull'efficienza di trasporto dell'eccitazione luminosa, e della fotosintesi più in generale, nei centri di reazione e nella catena di trasporto degli elettroni del PSII, mentre i livelli nelle foglie dell'isoforma Cyt della G6PDH, enzima chiave della via dei

pentosi fosfati, rimangono invariati, invece i livelli dell'isoforma P2 aumentano alla concentrazione di cadmio più alta adoperata (10^{-4} M), mentre i livelli dell'isoforma P1 presentano un andamento contrario rispetto l'isoforma P2; inoltre, non si osservano variazioni significative delle due isoforme (Cyt e P2) a livello radicale. L'effetto del cadmio si realizza con una lieve riduzione dell'attività enzimatica della G6PDH, sia in foglie che radici, in funzione dell'aumento della concentrazione di cadmio. Un comportamento opposto si osserva nell'attività enzimatica della nitrato reduttasi, enzima principale nella riduzione assimilativa dell'azoto (*Hernandez et al., 1996*), in funzione della concentrazione di cadmio, suggerendo che la attività NR sia relazionata all'aumento della superficie di assorbimento, a sua volta determinata dall'incremento del numero di radici laterali.

Bisogna ricordare però che l'inibizione esercitata dal cadmio non è specifica, ed è prodotta anche da altri cationi con affinità di legame per i gruppi funzionali delle proteine sovrapponibile a quella del cadmio.

I danni biochimici sono evidentemente dovuti a chiare alterazioni del metabolismo basale, come dimostrato dalla variazione sia nella presenza, sia nella qualità degli amminoacidi glutammato, glutammina, aspartato e asparagina, coinvolti nel processo di assimilazione dell'azoto, e glicina, serina e alanina, coinvolti nel processo di fotorespirazione. In particolare, nelle foglie i livelli del glutammato aumentano fino a cadmio 10^{-5} M (+ 36%), mentre nelle

radici i livelli di glutammato raddoppiano rispetto al controllo alla concentrazione di 10^{-4} M. I livelli di glutammina, nelle foglie, si dimezzano in seguito alla esposizione al cadmio mentre rimangono invariati nelle radici. I livelli di aspartato rimangono invariati sia in foglie che nelle radici, mentre la asparagina subisce un aumento (+ 50%) nelle foglie e un dimezzamento nelle radici. I livelli di serina, glicina e alanina rimangono sostanzialmente stabili nelle foglie, mentre nelle radici si osserva un forte aumento della glicina di tre volte a 10^{-4} M, e della alanina (+ 50%) all'esposizione al cadmio. Un forte aumento di ornitina si osserva nelle foglie a 10^{-5} M, mentre nelle radici si osserva oltre un forte aumento di ornitina anche di citrullina alla concentrazione di cadmio 10^{-4} M. Ricordiamo anche se il cadmio è un contaminante tossico degli ecosistemi, le piante hanno evoluto diversi meccanismi di risposta alla contaminazione da cadmio del suolo.

Il cadmio induce un declino del tasso di traspirazione e del contenuto di acqua nelle piante trattate (*Vassilev et al., 1997*), causa un ritardo della crescita delle foglie, della riduzione delle dimensioni e del differenziamento delle cellule di guardia (*Barcelo et al., 1988*). Inoltre, si osservano l'abbassamento del contenuto dei composti responsabili del mantenimento del turgore cellulare (*Hernandez et al., 1997*), l'aumentano del contenuto di Acido abscissico (ABA - l'ormone che regola la chiusura degli stomi e la traspirazione) (*Hollenbach et*

al., 1997), l'alterazione della respirazione cellulare e della fosforilazione ossidativa (*Kuznetsov et al.*, 1999).

Questi effetti inducono una risposta al deficit idrico nella pianta, promuovendo la produzione di prolina, un osmoregolatore fortemente coinvolto nella risposta agli stress abiotici, infatti, sugli studi eseguiti sulle piantine d'orzo, si osserva un declino del contenuto d'acqua (- 11,5%) direttamente proporzionale all'aumentare della concentrazione di cadmio.

Gli effetti del cadmio sulla respirazione cellulare, presumibilmente, sono dovuti all'inibizione del trasporto degli elettroni e di H^+ nei mitocondri disorganizzando, quindi, la catena di trasporto degli elettroni (*Heyno et al.*, 2008).

Un effetto tipico del cadmio è l'inibizione sia della fase luminosa che della fase oscura del processo fotosintetico (*Baryla et al.*, 2001). Il fotosistema II (PSII) viene particolarmente influenzato sia a livello del sito riducente (accettore) che a livello del sito ossidante (donatore); inoltre, sono colpiti dall'azione del cadmio anche il centro di reazione e la catena di trasporto degli elettroni del PSII, attraverso il danneggiamento della struttura degli enzimi, riducendo la loro attività. I dati in nostro possesso dimostrano che l'espressione della proteina D1 del fotosistema II e della Rubisco non è influenzata dalle diverse concentrazioni di cadmio, al contrario l'attività fotochimica risulta essere perturbata in seguito ad esposizione delle piante alle dosi più concentrate di

cadmio. Infatti dai quattro indici fotochimici esaminati (F_v/F_m , QY, ETR e NPQ), si evince che l'efficienza di conversione della luce al PSII non risulta essere compromessa fino al trattamento $Cd^{++} 10^{-5}$ M, mentre nel trattamento $Cd^{++} 10^{-4}$ M si osserva una riduzione significativa della fotochimica e al contempo, tutti i trattamenti con cadmio stimolano nelle foglie un incremento dei processi di dissipazione termica dell'energia luminosa assorbita.

La ridotta attività fotochimica potrebbe essere spiegata analizzando l'ultrastruttura dei cloroplasti che sembra perdere la sua integrità ad elevate concentrazioni di cadmio. Allo stesso tempo il declino di efficienza fotochimica potrebbe essere attribuibile anche al ridotto livello di pigmenti fotosintetici misurati nelle foglie più contaminate, che hanno presentato anche le più basse concentrazioni di amido. Osservazioni al SEM, hanno confermato alterazioni nell'organizzazione tilacoidale dei cloroplasti; anche il contenuto di amido (-48,6%) declina in funzione dell'aumento della concentrazione di cadmio. Tale andamento è riscontrato anche nel contenuto di pigmenti fogliari, dove il contenuto di clorofilla A (-35%) e B (-27%) e dei carotenoidi (-41%) diminuisce in funzione dell'aumento della concentrazione di cadmio. La variazione del contenuto dei pigmenti fogliari conferma gli effetti perturbanti sui centri di reazione osservati mediante la determinazione dell'efficienza fotosintetica.

Il meccanismo di protezione basato sulla parete cellulare e sul sequestro intracellulare del cadmio mediante le fitochelatine non sono gli unici processi utilizzati dalle piante per far fronte al danno indotto dal cadmio. Infatti, vi sono altri meccanismi protettivi che riducono la tossicità del cadmio che partecipano a risposte biochimiche (*Harada et al., 2010*).

I metalli pesanti causano danni ossidativi alle piante, direttamente o indirettamente, attraverso la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Alcuni metalli pesanti come rame e ferro possono essere tossici attraverso la loro partecipazione nei cicli redox come le reazioni Fenton e / o Haber-Weiss. Al contrario, il cadmio è un metallo non-redox e non produce ROS quali l'anione superossido (O_2^-), l'ossigeno singoletto (1O_2), il perossido d'idrogeno (H_2O_2), e il radicale idrossile (OH^\cdot), ma genera lo stress ossidativo, interferendo con il sistema di difesa antiossidante (*Benavides et al, 2005;. & Cho Seo, 2005;. Gratão et al, 2005*).

L'accumulo di grandi quantità di osmoliti, come la prolina, è una risposta adattativa delle piante esposte ad un ambiente stressante così da poter mitigare l'effetto inibitorio del cadmio sulla crescita.

L'etilene svolge un ruolo chiave in molti i processi fisiologici ma potrebbe giocare un ruolo, durante lo stress da cadmio, come induttore dell'attività dell'ascorbato perossidasi, necessaria per avviare il processo di detossificazione

del perossido d'idrogeno e come regolare dell'espressione dei geni codificanti le proteine antistress.

La risposta di piante al cadmio richiede l'attivazione di enzimi in grado di ripiegare le proteine, in quanto uno degli effetti intracellulare più drammatici causati dal cadmio è la denaturazione proteica. Queste proteine sono denominate proteine da shock termico (HSP) e i loro livelli incrementano dopo il trattamento con il cadmio (*Esposito et al., 2007*).

Molte classi di HSP sono state trovate nelle piante (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 sHSP) ma la proteina HSP70 ha un ruolo fondamentale in questo processo di recupero e “folding” delle proteine danneggiate durante le condizioni di stress; inoltre, le HSP70 sono importanti nel reintegro delle proteine intrinseche all'interno della membrana, ciò suggerisce che la necessità di ripiegare proteine è un prerequisito per mantenere l'attività cellulare durante lo stress da metalli pesanti (*Timperio et al., 2008*).

Le HSP70 sono state recentemente proposte quali potenziali biomarkers, e il Western blotting è stato proposto come metodo per rilevare effetti inquinanti dovuti ai metalli pesanti (*Esposito et al., 2012; Basile et al., 2013*); inoltre, sono stati dimostrati che gli effetti sono dose e tempo dipendente, così che l'esposizione a concentrazioni molto tossiche di metallo per brevi periodi provoca gli stessi effetti di esposizione per tempi medio - lunghi a concentrazioni meno elevate (*Basile et al., 2013*) e gli effetti misurati in

campioni esposti in zone inquinate sono analoghi, se non identici, a quelli osservati sulle stesse specie in campioni *in vitro* in condizioni controllate (*Basile et al., 2015*).

Dagli esperimenti eseguiti su *Hordeum vulgare* esposto a diversi livelli di cadmio è emerso che i livelli dell'isoforma citosolica e plastidiale delle HSP70 aumentano in funzione dell'incremento della concentrazione di cadmio mentre diminuisce in funzione del tempo di esposizione al metallo, sia in foglie che in radici; inoltre, i livelli dell'isoforma mitocondriale delle HSP70, in foglie e radici, mostrano un andamento contrario alle due forme compartimentate.

6. CONCLUSIONI

Il cadmio viene assorbito e maggiormente accumulato nelle radici, dove i suoi effetti inducono, macroscopicamente, una forte riorganizzazione dell'apparato radicale e, microscopicamente, la presenza di peli radicali a localizzazione casuale ed intesa sulla tutta superficie radicale, oltre ad un'evidente alterazione delle pareti del cilindro vascolare. Nell'apparato radicale, l'accumulo di cadmio ha effetto anche a livello intracellulare, in quanto va a modificare il metabolismo basale da come si evince dal profilo amminoacidico alterato, dall'incremento d'attività della nitrato reductasi e dalla lieve riduzione d'attività della G6PDH.

L'accumulo di cadmio nelle piantine non risulta confinato alla componente ipogea, ma in minor quantità il cadmio viene traslocato e accumulato nella parte aerea delle piante d'orzo, dove altera, macroscopicamente, le dimensioni e la turgidità delle foglie e, microscopicamente, altera la localizzazione dei cloroplasti e la loro struttura tilacoidale. Anche nella componente aerea delle piantine d'orzo il cadmio ha effetti intracellulari, poiché si osserva una diminuzione dell'efficienza fotosintetica correlata ad un decremento del contenuto di amido e di pigmenti fotosintetici. Inoltre, anche se presente in quantità minori, la quantità di cadmio che raggiunge l'ambiente citoplasmatico nelle cellule delle foglie è in grado di alterare il metabolismo basale nello stesso modo che avviene a livello radicale, ma di minore intensità.

La presenza e l'accumulo di cadmio induce le piantine d'orzo ad attuare una serie di risposte allo stress da come si può capire dall'incremento dei livelli delle varie isoforme di HSP70.

Infine, ulteriori studi saranno necessari per chiarire il ruolo delle fitochelatine, la regolazione a livello molecolare dell'espressione delle HSP70 e degli altri meccanismi coinvolti nella risposta allo stress da cadmio nei cereali.

7. BIBLIOGRAFIA

- **Akhtera M. F., Omelon C. R., , Gordon R. A., , Moser D., Macfiea S. M. (2014).** Localization and chemical speciation of cadmium in the roots of barley and lettuce. *Environmental and Experimental Botany*. Volume 100, Pages 10–19.
- **Alia Saradhi P. P. (1993).** Suppression in Mitochondrial Electron Transport Is the Prime Cause behind Stress Induced Proline Accumulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 193 Pages 54-58.
- **Asgher M., Khan N. A., Khan M. I. R., Fatma M., Masood A. (2014).** Ethylene production is associated with alleviation of cadmium-induced oxidative stress by sulfur in mustard types differing in ethylene sensitivity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 106, Pages 54–61.
- **Astolfi S., Zuchi S., Passera C. (2005).** Effect of cadmium on H^+ ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays L.*) plants. *Plant Science*. Volume 169, Pages 361–368.
- **Basile A., Sorbo S., Pisani T., Paoli L., Munzi S., Loppi, S. (2012).** Bioaccumulation and ultrastructural effects of Cd, Cu, Pb, and

Zninthemoss *Scorpiurum circinatum* (Brid.)Fleisch. Loeske.
Environmental Pollution. Volume 166, Pages 208–211.

- **Basile A., Sorbo S., Conte B., Cardi M., Esposito S. (2013).** Ultrastructural changes and Heat Shock Proteins 70 induced by atmospheric pollution are similar to the effects observed under in vitro heavy metals stress in *Conocephalum conicum* (Marchantiales-Bryophyta). Environmental Pollution. Volume 182, Pages 209–216.
- **Basile A., Sorbo S., Cardi M., Lentini M., Castiglia D., Cianciullo P., Conte B., Loppi S., Esposito S. (2015).** Effects of heavy metals on ultrastructure and Hsp70 induction in *Lemna minor* L. exposed to water along the Sarno River, Italy. Ecotoxicology and Environmental Safety. Volume 114, Pages 93–101.
- **Barcelo J., Vazques M. D., Poschenrieder Ch. (1988).** Structural and Ultrastructural Disorders in Cadmium-Treated Bush Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* L.), New Phytologist. Volume 108, Pages 37–49.
- **Baryla A., Carrier P., Frank F., Coulomb C., Sahut C., Havaux M. (2001).** Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. Planta. Volume 112, Pages 696-709.

- **Benavides M. P., Gallego S. M., Tomaro M. L. (2005).** Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. Volume 17, Pages 21–34.
- **Bleecker A. B., Kende H. (2000).** Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Volume 16, Pages 1–18.
- **Bilger W., Björkman O. (1990).** Role of xanthophyll cycle and energy dissipation in differently oriented faces of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*. Volume 25, Pages 173–185.
- **Borboa L., Delatorre C. (1996).** The Genotoxicity of Zn(II) and Cd(II) in *Allium cepa* Root Meristematic Cells, *New Phytologist*. Volume 134, Pages 481–486.
- **Carginale V., Sorbo S., Capasso C., Trinchella F., Cafiero G., Basile A. (2004).** Accumulation, localization, and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciata*. *Protoplasma*. Volume 223, Pages 53–61.
- **Carrier P., Baryl A., Havaux M. (2003).** Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil. *Planta*. Volume 216, Pages 939–950.

- **Chang Y., Zouari M., Gogorcena Y., Lucena J. J., Abadia J. (2003).** Effects of cadmium and lead on ferric chelate reductase activities in sugar beet roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. Volume 41, Pages 999–1005.
- **Chaoui A., Mazhoudi S., Ghorbal M. H., El Ferjani E. (1997).** Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Plant Science*. Volume 127, Pages 139–147.
- **Chaudri A., McGrath S., Gibbs P., Chambers B., Carlton-Smith C., Godley A., Bacon J., Campbell C., Aitken M. (2007).** Cadmium availability to wheat grain in soils treated with sewage sludge or metal salts. *Chemosphere*. Volume 66, Pages 1415–1423.
- **Chmielowska-Bąk J., Lefèvre I., Lutts S., Deckert J. (2013).** Short term signaling responses in roots of young soybean seedlings exposed to cadmium stress. *Journal Plant Physiology*. Volume 170, Pages 1585–1594.
- **Cho U., Seo N. H. (2005).** Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science*. Volume 168, Pages 113–120.

- **Choi Y. E., Harada E. (2005).** Roles of calcium and cadmium on Cd containing intra-and extracellular formation of Ca crystals in tobacco. *Journal of Plant Biology*. Volume 48, Pages 113–119.
- **Chugh L. K., Sawhney S. K. (1999).** Effect of Cadmium on Activities of Some Enzymes of Glycolysis and Pentose Phosphate Pathway in Pea, *Biologia Plantarum*. Volume 42, Pages 401–407.
- **Cosio C., De Santis L., Frey B., Diallo S., Keller C. (2005).** Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*. Volume 56, Pages 765–775.
- **Das P., Samantaray S., Rout G. R. (1997).** Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution*. Volume 98, Pages 29–36.
- **Dheri G. S., Singh Brar M., Malhi S. S. (2007).** Influence of phosphorus application on growth and cadmium uptake of spinach in two cadmium-contaminated soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. Volume 170, Pages 495–499.
- **Di Cagno R., Guidi L., De Gara L., Soldatini G. F., (2001).** Combined cadmium and ozone treatments affect photosynthesis and ascorbate-dependent defences in sunflower. *New Phytologist*. Volume 151, Pages 627–636.

- **El-Beltagi H. S., Mohamed A. A., Rashed M. M. (2010).** Response of antioxidative enzymes to cadmium stress in leaves and roots of radish (*Raphanus sativus L.*). Notulae Scientia Biologicae. Volume 2, Pages 76–82.
- **Evlard A., Sergeant K., Ferrandis S., Printz B., Renaut J., Guignard, C. (2014b).** Physiological and proteomic responses of different willow clones (*Salix fragilis x alba*) exposed to dredged sediment contaminated by heavy metals. International Journal of Phytoremediation. Volume 16, Pages 1148–1169.
- **Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L., (1996).** Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Science. Volume 121, Pages 151–159.
- **Gamalei Yu. V. (1997).** The Origin and Location of Plant Organelles. Russian Journal of Plant Physiology. Volume 44, Pages 115–137.
- **Genty B., Briantais J. M., Baker N. R. (1989).** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. Volume 990, Pages 87-92.
- **Giardini L., Baldoni R. (2002).** Coltivazioni erbacee: cereali e proteaginose, Bologna, Ed. Patron, 2002.

- **Gill S. S., Tuteja N. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. Volume 48, Pages 909–930.
- **Glavac V., Koenies H., Ebben U. (1990).** Seasonal Variation and Axial Distribution of Cadmium Concentrations in Trunk Xylem Sap of Beech Trees (*Fagus sylvatica L.*), *Angew Botanik*. Volume 64, Pages 357–364.
- **Godzik B. (1993).** Heavy Metals Content in Plants from Zinc Dumps and Reference Areas, *Polish Botanical Studies*. Volume 5, Pages 113–132.
- **Gratao P. L., Polle A., Lea P.J., Azevedo R. A. (2005).** Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Function of Plant Biology* Volume 32, Pages 481–494.
- **Groppa M. D., Tomaro M.L., Benavides M. P. (2001).** Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science*. Volume 161, Pages 481–488.
- **Gu C. S., Liu L. Q., Zhao Y. H., Deng Y. M., Zhu X. D., Huang S. Z. (2014).** Overexpression of *Iris lactea* var. *chinensis* metallothionein l1MT2a enhances cadmium tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Ectotoxicology and Environmental Safety*. Volume 105, Pages 22–28.
- **Guo T. R., Zhang G. P., Zhou M. X., Wu F. B., Chen J. X. (2007).** Influence of aluminium and cadmium stresses on mineral nutrition and

root exudates in two barley cultivars. *Pedosphere*. Volume 17, Pages 505–512.

- **Harad E., Kim J. A., Meyer A. J., Hell R., Clemens S., Choi Y. E. (2010).** Expression profiling of tobacco leaf trichomes identifies genes for biotic and abiotic stresses. *Plant and Cell Physiology*. Volume 51, Pages 1627-1637.
- **He J. L., Ma C. F., Ma Y. L., Li H., Kang J. Q., Liu T. X. (2013).** Cadmium tolerance in six poplar species. *Environmental Science and Pollution Research*. Volume 20, Pages 163–174.
- **Heyno E., Klose C., Krieger-Liszkay A. (2008).** Origin of cadmium induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytologist*. Volume 179, Pages 687–699.
- **Hernandez L. E., Carpena-Ruiza R., Garatea A. (1996).** Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *Journal of Plant Nutrition*. Volume 19, Pages 1581–1598.
- **Hollenbach B., Schreiber L., Hartung W., Dietz K. J. (1997).** Cadmium Leads to Stimulated Expression of the Lipid Transfer Protein Genes in Barley: Implications for the Involvement of Lipid Transfer Proteins in Wax Assembly. *Planta*. Volume 203, Pages 9–19.

- **Ievinsh G., Romanovskaya O. I. (1991)** Accelerated lignification as a possible mechanism of growth in winter rye seedlings caused by ethephon and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry*. Volume 29, Pages 327-331.
- **Islam M. M., Hoque M. A., Okuma E., Banu M. N. A., Shimoishi Y., Nakamura Y., Murata Y. (2009).** Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*. Volume 166, Pages 1587–1597.
- **Johnson G. N., Young A. J., Scholes J. D., Horton P. (1993).** The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant Cell and Environment*. Volume 16, Pages 673–679.
- **Jungmann J., Reins H. A., Schobert C., Jentsch S. (1993).** Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature*. Volume 361, Pages 369-371.
- **Karina B. B., Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M. L., (2003).** Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Function Plant Biology* Volume 30, Pages 57–64.
- **Kessler A., Brand M. D. (1994).** Quantitative Determination of the Regulation of Oxidative Phosphorylation by Cadmium in Potato Tuber

Mitochondria, European Journal of Biochemistry. Volume 225, Pages 923–935.

- **Khan M. I. R., Asgher M., Khan N. A. (2014).** Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata L.*). Plant Physiology and Biochemistry. Volume 80, Pages 67–74.
- **Kitajima M., Butler W. L. (1975).** Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. Biochimica et Biophysica Acta. Volume 376, Pages: 105–115.
- **Kirkham M. B. (2006).** Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. Geoderma, Volume 137, Pages 19–32.
- **Kudo H., Kudo K., Ambo H., Uemura M., Kawai S. (2011).** Cadmium sorption to plasma membrane isolated from barley roots is impeded by copper association onto membranes. Plant Science. Volume 180, Pages 300–305.
- **Kositsin A. V. (1991)** Interaction between Metals and Enzymes, Ustoichivost' k tyazhelym metallam dikorastushchikh vidov (Tolerance of

Plant Species Grown in the Wild to Heavy Metals). Lenuprizdat. Pages 15–22.

- **Kranner I., Colville L. (2011).** Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, Volume 72, Pages 93–105.
- **Krause G. H., Weis E. (1991).** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basic. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Volume 42, Pages 313-349.
- **Kupper H., Parameswaran A., Leitenmaier B., Trtilek M., Šetlik I. (2007).** Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*. Volume 175, Pages 655–674.
- **Kuznetsov V. V., Shevyakova N. I. (1999)** Proline under Stress: Biological Role, Metabolism, and Regulation. *Russian Journal Plant Physiology*. Volume 46, Pages 321–336.
- **Lakimova E. T., Woltering E. J., Kapchina-Toteva V. M. (2008).** Cadmium toxicity in cultured tomato cells-role of ethylene, proteases and oxidative stress in cell death signaling. *Cell Biology International*. Volume 32, Pages 1521–1529.

- **Leita L., Marchiol L., Martin M., Petessotti, A. (1995).** Transpiration Dynamics in Cadmium Treated Soybean (*Glycine max* L.) Plants. *Journal of agronomy and Crop Science*. Volume 175, Pages 153–156.
- **Leita L., Denobili M., Cesco S., Mondini C. (1996).** Analysis of Intercellular Cadmium Forms in Roots and Leaves of Bush Bean. *Journal of plant nutrition*. Volume 19, Pages 527–533.
- **Lequeux H., Hermans C., Lutts S., Verbruggen N. (2010).** Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiology and Biochemistry*. Volume 48, Pages 673–682.
- **Li Y. M., Chaney R. L., Schneider A. A. (1994).** Effect of soil chloride level on cadmium concentration in sunflower kernels. *Plant and Soil*. Volume 167, Pages 275–280.
- **Li Z., Li L., Chen G. P. J. (2005).** Bioavailability of Cd in a soil–rice system in China: soil type versus genotype effects. *Plant and Soil*. Volume 271, Pages 165–173.
- **Loeffler S., Hochberger A., Grilli E., Gekeler W., Winnacker E. L., Zenk M. H. (1989).** Termination of the phytochelatinsynthase reactions through sequestration of heavy metals by reaction products. *FEBS Letters*. Volume 258, Pages 42–46.

- **Lozano-Rodriguez E., Hernandez L. E., Bonay P., Carpena-Ruiz R. O. (1997).** Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological distribution. *Journal of Experimental Botany*. Volume 48, Pages 123–128.
- **Lui D., Jiang W., Wang W., Zhai L. (1995).** Evaluation of Metal Ion Toxicity on Root Tip Cells by the Allium Test. *Israel Journal of Plant Sciences*. Volume 43, Pages 125–133.
- **Lux A. (2010).** Does diversity in root structure affect the diversity in cadmium uptake by plants? Opinion paper. *Agrochimica* Volume 54, Pages 342–352.
- **Maxwell K., Johnson G. N. (2000).** Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. Volume 345, Pages 659-668.
- **Markovska Y., Gorinova N., Nedkovska M., Miteva K. (2009).** Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Brassica juncea* plants. *Biologia Plantarum*. Volume 53, Pages 151–154.
- **Masood A., Iqbal N., Khan N. A. (2012).** Role of ethylene in alleviation of cadmium-induced photosynthetic capacity inhibition by sulphur in mustard. *Plant Cell Environmental*. Volume 35, Pages 524–533.

- **Mazen A. M. A., El Maghraby O. M. O. (1997/98).** Accumulation of Cadmium and Strontium, and a Role of Calcium Oxalate in Water Hyacinth Tolerance, *Biologia Plantarum*. Volume 40, Pages 411–417.
- **Metwally A., Safronova V. I., Belimov A. A., Dietz K. J. (2005).** Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *Journal of Experimental Botany*. Volume 56, Pages 167–178.
- **Milone M. T., Sgherri C., Clijsters H., Navari-Izzo F., (2003).** Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*. Volume 50, Pages 265–276.
- **Mishra V. K., Kim K. H. , Kang C. H., Choi K. C. (2004)** Wintertime sources and distribution of airborne lead in Korea. *Atmospheric Environment*. Volume 38, Pages 2653 – 2664.
- **Montero-Palmero M. B., Martín-Barranco A., Escobar C., Hernández L. E. (2013).** Early transcriptional responses to mercury: a role for ethylene in mercury-induced stress. *New Phytologist*. Volume 201, Pages 116–130.
- **Moussa H., El-Gamal S. (2010).** Effect of salicylic acid pretreatment on cadmium toxicity in wheat. *Biologia Plantarum* Volume 54, Pages 315–320.

- **Sigfridsson K. G. V., Bernat G., Mamedov F., Styring S. (2004).** Molecular interference of Cd^{2+} with Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. Volume 1659, Pages 19–31.
- **Nedjimi B., Daoud Y. (2009).** Cadmium accumulation in *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. *Flora- Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. Volume 204, Pages 316–324.
- **Neumann D., Lichtenberger O., Gunther D., Tschiersch K., Nover L. (1994).** Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta*. Volume 194, Pages 360-367.
- **Obata H., Umebayashi M. (1997).** Effects of Cadmium on Mineral Nutrient Concentrations in Plants Differing in Tolerance for Cadmium, *Journal of Plant Nutrition*. Volume 20, Pages 97–105.
- **Obroucheva N. V., Bystrova E. I., Ivanov V. B., Antipova O. V., Seregin I. V. (1998).** Root Growth Responses to Lead in Young Maize Seedlings, *Plant Soil*. Volume 200, Pages 55–61.
- **Oporto C., Smolders E., Degryse F., Verheyen L., Vandecasteele C. (2009).** DGT-measured fluxes explain the chloride-enhanced cadmium uptake by plants at low but not at high Cd supply. *Plant and Soil*. Volume 318, Pages 127–135.

- **Ouariti O., Boussama N., Zarrouk M., Cherif A., Habib Ghorbal M. (1997).** Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry*. Volume 45, Pages 1343–1350.
- **Parrotta L., Guerriero G., Sergeant K., Cai G., Hausman J. F. (2015).** Target or barrier? The cell wall of early and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanism. *Frontiers in Plant Science* Volume 6, Article 133.
- **Piršelová B., Mistríková V., Libantová J., Moravčíková J., Matušíková I. (2012).** Study on metal-triggered callose deposition in roots of maize and soybean. *Biologia*. Volume 67, Pages 698–705.
- **Popelka J. C., Shubert S., Schulz R., Hansen A. P. (1996)** Cadmium Uptake and Translocation during Reproductive Development of Peanut (*Arachis hypogaea L.*), *Angewandte Botanik*. Volume 70, Pages 140–143.
- **Popova L., Maslenkova L., Yordanova R., Krantev A., Szalai G., Janda T. (2008).** Salicylic acid protects photosynthesis against cadmium toxicity in pea plants. *General and Applied Plant Physiology (Special issue)*. Volume 34, Pages 133–144.
- **Popova L. P., Maslenkova L. T., Yordanova R. Y., Ivanova A. P., Krantev A. P., Szalai G., Janda T., (2009).** Exogenous treatment with

- salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. Volume 47, Pages 224–231.
- **Rau S., Miersch J., Neumann D., Weber E., Krauss G. J. (2007).** Biochemical responses of the aquatic protein levels. *Environmental and Experimental Botany*. Volume 59, Pages 299-306.
 - **Reese R. N., Roberts L. M. (1985).** Effect of Cadmium on Whole Cell and Mitochondrial Respiration in Tobacco Cell Suspension Cultures (*Nicotiana tabacum L. var. Xanthi*), *Journal of plant physiology*. Volume 120, Pages 123–130.
 - **Salt D. E., Prince R. C., Pickering I. J., Raskin I. (1995).** Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard, *Plant Physiology*. Volume 109, Pages 1427–1433.
 - **Samardakiewicz S., Strawinski, P, Wozny A. (1996).** The Influence of Lead on Callose Formation in Roots of *Lemna minor L.*, *Biologia Plantarum*. Volume 38, Pages 463–467.
 - **Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gomez M., Romero-Puertas M. C., Del Rio L. A. (2001).** Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*. Volume 52, Pages 2115–2126.

- **Sanità di Toppi L., Gabbrielli R. (1999).** Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*. Volume 41, Pages 105-13.
- **Sarvari E., Fodor F., Cseh E., Varga A., Zaray G, Zolla L. (1999)** Relationship between changes in ion content of leaves and chlorophyll-protein composition in cucumber under Cd and Pb stress. *Z Naturforsch.* Volume 54c, Pages 746-753.
- **Schat H., Sharma S. S., Vooijs R. (1997).** Heavy Metal-Induced Accumulation of Free Proline in a Metal-Tolerant and a Non-Tolerant Ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum*. Volume 107, Pages 477–482.
- **Scheller H. V., Huang B., Hatch E., Goldsbrough P. B. (1987).** Phytochelatins synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiology*. Volume 85, Pages 1031-1035.
- **Schellingen K., Der Straeten D. V., Vandenbussche F., Prinsen E. (2014).** Cadmium-induced ethylene production and responses in *Arabidopsis thaliana* rely on ACS2 and ACS6 gene expression. *BMC Plant Biology*. Volume 14, Pages 214.
- **Schreiber U., Bilger W., Neubauer C. (1994) .** Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis.

In: Schulze E-D, Caldwell MM (eds), Ecophysiology of Photosynthesis. Volume1, Pages 49-70.

- **Schreiber L., Hartmann K., Skrabs M., Zeier J. (1999)** Apoplastic Barriers in Roots: Chemical Composition of Endodermal and Hypodermal Cell Walls. *Journal Experimental Botany*. Volume 50, Pages 1267–1280.
- **Senden M. H. M. N., Vandermeer A. J. G. M., Verburg T. G., Wolterbeek H. T. (1995).** Citric Acid in Tomato Plant Roots and Its Effect on Cadmium Uptake and Distribution. *Plant Soil*. Volume 171, Pages 333–339.
- **Seregin I. V., Ivanov V. B. (1997).** Histochemical Investigation of Cadmium and Lead Distribution in Plants. *Russian Journal Plant Physiology*. Volume 44, Pages 915–921.
- **Sergio E., Cobianchi R. C., Sorbo S., Conte B., Basile A. (2007).** Ultrastructural alterations and HSP70 induction in *Elodea canadensis* Michx. exposed to heavy metals. *Caryologia*. Volume 60, Pages 115-120.
- **Sersen F., Kral'ova K. (2001).** New facts about CdCl₂ action on the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts and its comparison with HgCl₂ action. *Photosynthetica*. Volume 39, Pages 575–580.
- **Seth C. S., Misra V., Chauhan L. K. S., Singh R. R., (2008).** Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*:

cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* Volume 71, Pages 711–716.

- **Shaw B. P. (1995).** Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biologia Plantarum*. Volume 37, Pages 587–596.
- **Siedlecka A., Samuelsson G., Gardenstrom P., Kleczkowski L.A., Krupa Z. (1998).** The “activatory model” of plant response to moderate cadmium stress-relationship between carbonic anhydrase and Rubisco. In: G. Garab (ed.). *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Pages 2677–2680. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic.
- **Singh B., Narwan B., Jen A., Almas A., (1995).** Crop uptake and extractability of cadmium in soils naturally high in metals at different pH levels. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. Volume 26, Pages 2123–2142.
- **Solti A., Sarvari E., Toth B., Basa B., Levai L., Fodor F. (2011).** Cd affects the translocation of some metals either Fe-like or Ca-like way in poplar. *Plant Physiology and Biochemistry*. Volume 49, Pages 494–498.
- **Souza V. L., De Almeida A. A. F., Lima S. G .C., De M. C., Da C. S., Mangabeira P. A. O. (2011).** Morphophysiological responses and

- programmed cell death induced by cadmium in *Genipa Americana* L. (*Rubiaceae*). *Biometals*. Volume 24, Pages 59–71.
- **Srivastava A. K., Venkatachalam P., Raghothama K. G., Sahi S. V. (2007).** Identification of lead-regulated genes by suppression subtractive hybridization in the heavymetal accumulator *Sesbania drummondii*. *Planta*. Volume 225, Pages 1353–1365.
 - **Timperio A. M., Egidio M. G., Zolla L. (2008).** Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*. Volume 71, Pages 391-411.
 - **Uegsegger A., Schmutz D., Brunold C. (1990).** Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology*. Volume 93, Pages 1579–1584.
 - **Uraguchi S., Kiyono M., Sakamoto T., Watanabe I., Kuno K. (2009).** Contributions of apoplasmic cadmium accumulation, antioxidative enzymes and induction of phytochelatins in cadmium tolerance of the cadmium accumulating cultivar of black oat (*Avena strigosa* Schreb.). *Planta*. Volume 230, Pages 267–276.
 - **Vassilev A., Yordanov I., Tsonev T. (1997).** Effects of Cd²⁺ on the Physiological State and Photosynthetic Activity of Young Barley Plants. *Photosynthetica*. Volume 34, Pages 293–302.

- **Vodnik D., Jentschke G., Fritz E., Gogala N., Godbold D. L. (1999).** Root-Applied Cytokinin Reduces Lead Uptake and Affects Its Distribution in Norway Spruce Seedlings. *Physiologia Plantarum*. Volume 106, Pages 75–81.
- **Vogeli-Lange R., Wagner G. J. (1996).** Relationship between Cadmium, Glutathione and Cadmium-Binding Peptides (Phytochelatins) in Leaves of Intact Tobacco Seedlings, *Plant Sciences*. Volume 114, Pages 11–18.
- **Wahid A., Ghani A., Javed F. (2008).** Effect of cadmium on photosynthesis, nutrition and growth of mungbean. *Agronomy for Sustainable Development*. Volume 28, Pages 273–280.
- **Wang Y., Huang J., Gao Y. (2012).** Arbuscular mycorrhizal colonization alters subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Medicago sativa* L. and resists cadmium toxicity. *PLOS one*. Volume 7: e48669.
- **Whitelaw C. A., Le Huquet, J. A., Thurman, D. A., Tomsett A. B. (1997).** The isolation and characterization of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Molecular Biology*. Volume 33, Pages 503-511.
- **Wierzbicka M. (1984)** Ultrastructural Location of Lead in the Cell Walls of *Allium cepa* L. Roots. *Postepy Biologii Komorki*. Volume II, Pages 509–512.

- **Wierzbicka M. (1994).** Resumption of Mitotic Activity in *Allium cepa* Root Tips during Treatment with Lead Salts. Environmental of Experimental Botany. Volume 34, Pages 173–180.
- **Xing J. P., Jiang R. F., Ueno D., Ma J. F., Schat H., McGrath S. P. (2008).** Variation in root-to-shoot translocation of cadmium and zinc among different accessions of the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi praecox*. New Phytologist. Volume 178, Pages 315–325.
- **Yang X., Baligar V. C., Martens D. C., Clark R. B. (1995).** Influx, Transport and Accumulation of Cadmium in Plant Species Grown at Different Cd²⁺ Activities. Journal of Environmental Science and Health. Volume 30, Pages 569–583.
- **Yang J., Pan X. (2013).** Root exudates from sunflower (*Helianthus annuus L.*) show a strong adsorption ability toward Cd(II). Journal of Plant Interactions Volume 8, Pages 263–270.
- **Yamaguchi N., Mori S., Baba K., Kaburagi-Yada S., Arao T., Kitajima N. (2011).** Cadmium distribution in the root tissues of *solanaceous* plants with contrasting root-to-shoot Cd translocation efficiencies. Environmental and Experimental Botany. Volume 71, Pages 198–206.

- **Yilmaz D. D., Parlak K. U. (2011).** Changes in proline accumulation and antioxidative enzyme activities in *Groenlandia densa* under cadmium stress. *Ecological Indicators*. Volume 11, Pages 417–423.
- **Zhang J., Shu W. S. (2006).** Mechanisms of heavy metal cadmium tolerance in plants. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*. Volume 32, Pages 1–8.
- **Zhang J., Wu H., Wang X., Huang W. (2010a).** Subcellular distribution and chimica forms of cadmium in the cells of strawberry (*Fragaria x ananassa Duch.*). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Volume 85, Pages 563–569.
- **Zhang W., Lin K., Zhou J., Zhang W., Liu L., Zhang Q. (2014c).** Cadmium accumulation, subcellular distribution and chimica forms in rice seed lignin the presence of sulfur. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Volume 37, Pages 348–353.
- **Zhao F. J., Hamon R. E., Lombi E., McLaughlin M. J., McGrath S. P., (2002).** Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*. Volume 53, Pages 535–543.
- **Zheljazkov V. D., Nielsen N. E. (1996).** Effect of Heavy Metals on Peppermint and Cornmint. *Plant Soil*. Volume 178, Pages 12–20.

- **Zhou B., Yao W., Wang S., Wang X., Jiang T. (2014).** The metallothionein gene, TaMT3, from *Tamarix androssowii* confers Cd²⁺ tolerance in tobacco. *International Journal of Molecular Science*. Volume 15, Pages 10398–10409.